



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Ciencias Biológicas

Unidad de Posgrado

**Análisis transcriptómico de la respuesta al estrés por
helada en dos variedades de *Solanum tuberosum* subsp.
*andigena***

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Biología
Molecular

AUTOR

Diana Susana MARTÍNEZ CORCINO

ASESOR

Mg. Gustavo Adolfo SANDOVAL PEÑA

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Martínez, D. (2019). *Análisis transcriptómico de la respuesta al estrés por helada en dos variedades de Solanum tuberosum subsp. andigena*. [Tesis de maestría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Unidad de Posgrado]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

VICEDECANATO DE INVESTIGACION Y POSGRADO

UNIDAD DE POSGRADO

Exped. N° 169-UPG-FCB-2018

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE
MAGÍSTER EN LA MAESTRÍA DE INVESTIGACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

Siendo las 10:10 horas del día 14.01.2019 en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas, el Jurado de Tesis presidido por:

Dra. Rina Lastenia Ramírez Mesias	e integrado por
Dr. Enrique Walter Mamani Zapana	(Miembro)
Mg. Erasmo Honorio Colona Vallejos	(Miembro)
Mg. Gustavo Adolfo Sandoval Peña	(Asesor)

Se reunió para la sustentación oral y pública de la Tesis para optar al Grado Académico de Magíster en la Maestría de Investigación en Biología Molecular, que solicitara la Bachiller Doña **DIANA SUSANA MARTÍNEZ CORCINO**.

Después de darse lectura al Expediente N° 169-UPG-FCB-18, en el que consta haberse cumplido con todas las disposiciones reglamentarias, los señores miembros del Jurado, recibieron la exposición de la Tesis Titulada:

“Análisis transcriptómico de la respuesta al estrés por helada en dos variedades de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*”, y formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por la graduando.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



VICEDECANATO DE INVESTIGACION Y POSGRADO

UNIDAD DE POSGRADO

Acto seguido el Jurado procedió a la votación la que dio como resultado el calificativo de: Excelente con la nota de 19

A continuación la Presidente del Jurado de Tesis recomienda que la Facultad proponga que la Universidad le otorgue el grado académico de Magíster en la Maestría de Investigación en Biología Molecular a la Bachiller Diana Susana Martínez Coreiro

Siendo las 12:15 se levantó la Sesión, recibiendo la graduando las felicitaciones de los señores miembros del Jurado y público asistente.

Se extiende la presente Acta en Lima, a los 17 días del mes de enero del año 2019.

Dra. Rina Lastenia Ramírez Mesías
Profesora Principal a D.E.
PRESIDENTE
REGINA N° 17561

Mg. Gustavo Adolfo Sandoval Peña
Profesor Asociado a T.C.
ASESOR
REGINA N° 13729

Dr. Enrique Walter Mamani Zapana
Profesor Asociado a T. C.
MIEMBRO
REGINA N° 15757

Mg. Erasmo Honorio Colona Vallejos
Profesor Asociado a D. E.
MIEMBRO
REGINA N° 13690

AGRADECIMIENTOS

Al Mg. Edgar Neyra y al Mg. Gustavo Sandoval, asesores de la tesis, por las sugerencias recibidas durante la realización del presente trabajo. Al Dr. Carlos, por la oportunidad de permitirme participar en el proyecto. Al Ing. Demetrio y al personal de UDEA por su valiosa ayuda en los trabajos de campo. A la Dra. Noemí Zúñiga, por compartir sus valiosos conocimientos y experiencia sobre el cultivo de papa.

A todos los integrantes de la Unidad de Genómica de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, en especial a Paty y a “CP”, con los que compartí experiencias dentro y fuera del laboratorio, que jamás olvidaré. A mis amigas de la universidad: Clau, Mary y Vane, por acompañarme con sus ánimos y palabras de apoyo durante la realización de esta tesis. Gracias por su valiosa y sincera amistad.

A César, por acompañarme y tranquilizarme durante mis tantos y muchas veces “tontos” momentos de estrés, por tu cariño, paciencia y comprensión durante toda esta etapa.

A mis tíos, sobretodo a mi tío “papi”, por sus consejos y apoyo incondicional tanto en mi vida profesional como personal. A mis hermanas: Paty y Anita, por llenarme de alegría día tras día, por estar siempre a mi lado apoyándome de distintas maneras durante todo este período.

Y a las personas más importantes en mi vida, mis padres: Julio y Julia, por confiar en mí, por sus consejos y palabras de aliento que me ayudaron a no desistir, especialmente en los últimos meses.

A la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, en especial a la Unidad de Posgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas, a mis profesores de la Maestría de Biología Molecular, por los conocimientos recibidos durante mis estudios de posgrado. A mi jurado de tesis integrado por los profesores Rina Ramírez, Erasmo Colona y Enrique Mamani, por el tiempo dedicado en la revisión de esta tesis. Al personal administrativo de posgrado, sobretodo a Dorita por la ayuda y paciencia durante el trámite.

Finalmente, al Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (Innovate Perú), bajo el contrato 120-FINCyT-IA-2013, por el financiamiento concedido para la ejecución del proyecto.

DEDICATORIA

A mis queridos padres, Julia y Julio

A mis hermanas, Paty y Anita

A mi tío "Papi", a quien siempre veré como un padre

Por acompañarme y apoyarme en esta etapa...

finalmente concluida

CONTENIDO

ABREVIATURA	4
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
I. INTRODUCCIÓN	7
II. ANTECEDENTES	9
III. HIPÓTESIS	19
IV. OBJETIVOS	19
V. MATERIAL Y MÉTODOS	20
VI. RESULTADOS	32
VII. DISCUSIÓN	55
VIII. CONCLUSIONES	67
IX. RECOMENDACIONES	68
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

ABREVIATURA

cDNA	DNA complementario
DEGs	Genes expresados diferencialmente
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EST	Secuencias de etiquetas expresadas
FAO	Food and Agriculture Organization
<i>Fold change</i>	Cambio de expression
FT	Factores de transcripción
GC	Guanina y citosina
GO	Ontología génica
LTP	Proteínas de transferencia de lípidos
<i>Microarrays</i>	Microarreglos
mRNA	RNA mensajero
NGS	Secuenciamiento de Nueva Generación
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PGSC	Consorcio de secuenciamiento del genoma de papa
<i>Phred score</i>	Valor de calidad de secuencias
<i>Reads</i>	Secuencias obtenidas del secuenciamiento de tipo <i>Illumina</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNA-seq	Secuenciamiento de ARN
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPKM	Lecturas por kilobase de exón por millón de fragmentos mapeados
SBS	Secuenciamiento por síntesis
YM	Yana Manwa, variedad tolerante de <i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>andigena</i>
YG	Yuraq Gaspar, variedad susceptible de <i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>andigena</i>

RESUMEN

La helada se caracteriza por el descenso de la temperatura del aire bajo los cero grados Celsius, es uno de los problemas más severos para la agricultura andina, siendo las regiones más afectadas del Perú, aquellas ubicadas entre los 2 500 y 3 500 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.). Estudios a nivel morfológico y fisiológico indican que las papas nativas constituyen importantes fuentes de genes relacionados con la tolerancia a heladas. Sin embargo, aún son desconocidos los mecanismos moleculares de tolerancia en estas papas.

La tecnología de secuenciación de RNA (RNA-seq) es una excelente herramienta para identificar cambios en el perfil de expresión de los genes. En este estudio, utilizando RNA-seq, realizamos un análisis comparativo del transcriptoma de dos variedades de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* con respuesta contrastante al estrés de helada. Se alinearon más de 199 millones de lecturas usando el genoma de referencia *Solanum tuberosum* Group *Phureja*, que correspondió al 82.3% de las lecturas totales obtenidas tras el secuenciamiento.

Se identificaron 279 y 160 genes expresados diferencialmente en Yana Manwa (YM, variedad tolerante al estrés por helada) y Yuraq Gaspar (YG, variedad susceptible), respectivamente. En general, los genes expresados diferencialmente enriquecidos (DEGs) estuvieron implicados en la estructura de la pared celular, metabolismo de carbohidratos, enzimas con actividad antioxidante. Además, identificamos DEGs asociados a diferentes factores de transcripción.

Estos resultados proporcionan nuevos conocimientos sobre los sistemas de regulación de la tolerancia a la congelación de la papa y proporcionan recursos genéticos para estudios posteriores.

Palabras claves: estrés por helada, papa nativa, secuenciamiento de RNA, transcriptoma, expresión.

ABSTRACT

Frost is the decrease air temperature below zero degrees Celsius. It is of the most severe problems to Andean's agriculture being the most affected regions of Peru, those located between 2,500 and 3,500 meters above sea level (m.a.s.l). Studies at the morphological and physiological level show that native potatoes are important sources of genes related to freezing tolerance. Nevertheless, the molecular mechanisms of tolerance in these potatoes are still unknown.

RNA sequencing (RNA-seq) is an excellent tool to identify genes expression profile changes. In this study, using RNA-seq, we performed a comparative transcriptome analysis of two potatoes varieties of *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* with opposite response to freezing. Over 199 million reads were aligned to the potato reference genome (*Solanum tuberosum* Group *Phureja*), which corresponded to 82.3% of the total reads obtained after sequencing.

279 and 160 differentially expressed genes (DEGs) were identified in YM (tolerant potato) and YG (susceptible potato), respectively. Most enriched DEGs (differentially expressed genes) were involved in the cell wall structure, carbohydrate metabolism, antioxidant enzymes. Furthermore, we identified DEGs associated with different transcription factors.

These results provide new insights into potato freezing tolerance regulation systems and provide gene resources for subsequent studies.

Key words: *freezing stress, native potato, RNA-seq, transcriptome, expression.*

I. INTRODUCCIÓN

La helada es uno de los principales factores abióticos más dañinos para la agricultura en los Andes, llegando a causar hasta pérdida total de la producción de un cultivo (Torres & Cubas, 2007).

Las bajas temperaturas afectan la productividad agrícola de las comunidades (Alarcón & Trebejo, 2010). Fairlie & Ortega (1995), reportaron que la ocurrencia de helada entre los estadios de emergencia y formación de estolones, provocaron reducción del rendimiento en 30% y 50%, y mayor del 50% de suceder en la etapa de floración.

La papa es conocida por tener la mayor diversidad genética de todas las plantas cultivadas (Roca *et al.*, 2003). Sin embargo, la mayoría de las variedades de papa cultivadas son sensibles a temperaturas inferiores a -3 °C, observándose daños a nivel foliar y disminución en el rendimiento y calidad de tubérculos (Chen & Li, 1980).

Existen estudios a nivel morfológico y fisiológico que indican a las papas nativas como fuentes de tolerancia genética al estrés por helada, constituyendo un reservorio genético potencialmente útil para futuros programas de mejoramiento del cultivo de papa (Ochoa, 2001). Por otro lado, dentro de la región andina, se ha identificado variedades tolerantes de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* a factores abióticos como la sequía (Bedogni *et al.*, 2009; Mamani-Rojas y François-Ledent, 2014).

La tolerancia al estrés por helada en término genético es definida como un carácter complejo cuantitativo controlado por muchos genes, aún completamente desconocidos (Stone *et al.*, 1993). Rensink *et al.* (2005b) identificaron a través de la tecnología de microarreglos (*microarrays*) la expresión de 2 000 genes en respuesta al estrés por frío, de los cuales varios genes fueron compartidos con la

respuesta al estrés salino y a altas temperaturas. No obstante, esta tecnología presenta ciertas limitaciones como el bajo rendimiento y sensibilidad (Wang *et al.*, 2009).

En los últimos años, el desarrollo de nuevas tecnologías de secuenciamiento de alto rendimiento como el secuenciamiento de RNA (RNA-seq), llegó a superar las limitaciones de los *microarray*, permitiendo la identificación y cuantificación de transcritos de baja expresión con mayor sensibilidad (Lister *et al.*, 2009).

En la actualidad, existen diversos estudios transcriptómicos de la respuesta al estrés por helada en cultivos de *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Triticum aestivum*, *Brassica juncea* y *Lillium lancifolium* (Ren *et al.*, 2012; Nakaminami *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014; Gulick *et al.*, 2005; Sinha *et al.* 2015, Wang *et al.*, 2014). Sin embargo, hasta la fecha, no se han reportado trabajos sobre *Solanum tuberosum* subesp. *andígena*.

En este sentido, el presente trabajo tuvo por objetivo identificar genes involucrados en la tolerancia al estrés por helada, a través del análisis y comparación del transcriptoma por RNA-seq de dos variedades de papas nativas *Solanum tuberosum* subsp. *andígena* tras el estrés por helada.

II. ANTECEDENTES

2.1 LA PAPA

Es el tercer cultivo más consumido en el mundo y, el primer cultivo no cereal más importante debido a su alto valor nutricional, adaptabilidad a diferentes climas y sistemas de cultivo (Pino *et al.*, 2007; Devaux *et al.*, 2010), con una producción mundial estimada por encima de los 350 millones de toneladas (FAO, 2008).

La papa es una planta herbácea del género *Solanum*. Triveño *et al.* (2011) indicaron que, en el Perú, la papa es cultivada en la mayoría de los pisos ecológicos (con altitudes de hasta 4000 m.s.n.m.), siendo las principales zonas de producción: Áncash, Andahuaylas, Ayacucho, Cajamarca, Cusco, Huancavelica, Huánuco, Junín y Puno (MINAGRI, 2017). Además, la producción del cultivo de papa ha incrementado en los últimos años (INEI, 2014) (Figura 1)

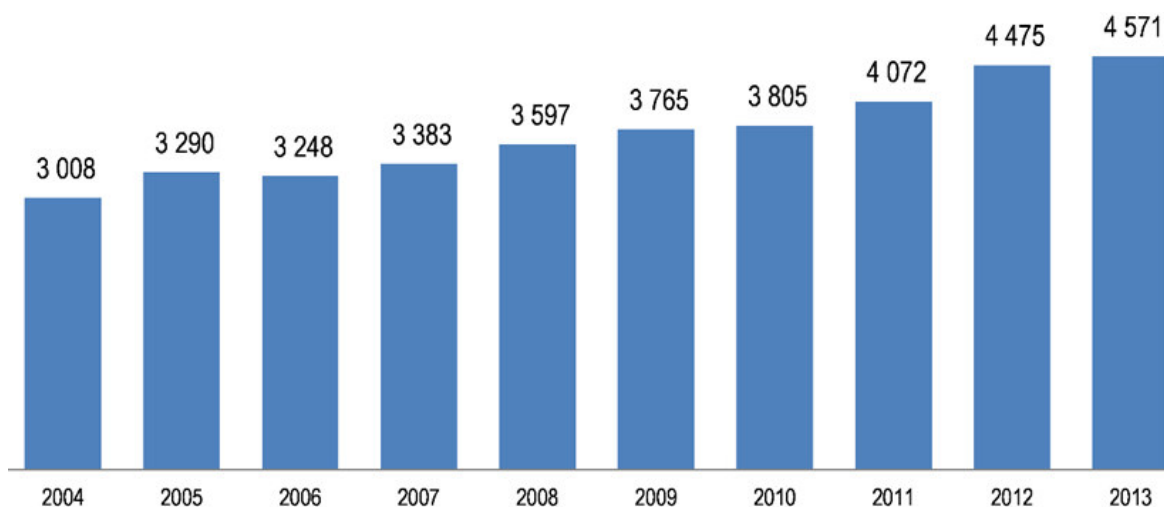


Figura 1: Producción de Papa entre los años 2004 a 2013 (expresado en miles de toneladas).

Fuente: INEI, 2014

Si bien la papa cultivada internacionalmente pertenece a una única especie botánica: *Solanum tuberosum*, existen miles de variedades con diferencias de tamaño, color, forma, textura y cualidades (FAOSTAT, 2008). En el 2002, Huamán & Spooner, reconocieron a todas las papas cultivadas como una sola

especie *Solanum tuberosum*, con ocho grupos: *Ajanhuiri*, *Andigenum*, *Chaucha*, *Chilotanum*, *Curtilobum*, *Juzepczukii*, *Phureja* y *Stenotomum*. La subespecie *andigena* es una de las subespecies más cultivadas en los Andes (Huamán, 1986; Condori *et al.*, 2014).

2.2 HELADAS

a. Estrés

El término estrés ha sido definido de diferentes maneras. Levitt (1980) indicó que la definición de estrés hace referencia a un elemento del ambiente perjudicial para el ser vivo. Lichtenthaler (1996) definió al estrés en planta como condición desfavorable que afecta o bloquea el metabolismo, crecimiento o desarrollo de la planta.

El estrés en las plantas se puede dividir en dos grandes grupos: a) bióticos, ocasionados por organismos vivos como patógenos, hongos, bacterias, virus y nemátodos y b) abióticos, como el calor, la sequía, la salinidad y bajas temperaturas (Bahmani & Maali-Amiri, 2015).

b. Estrés por congelamiento o helada

Las plantas se desarrollan óptimamente dentro de un rango de temperatura. Por lo tanto, las temperaturas fuera de este rango inducen situaciones de estrés (Yadav, 2010). El estrés por bajas temperaturas es un problema de gran importancia y con un fuerte impacto negativo sobre la agricultura en los Andes (Frère *et al.*, 1975; Rihan *et al.*, 2017).

Existen dos tipos de estrés ocasionados por las bajas temperaturas (Sharma *et al.*, 2005):

- Estrés por frío (*Chilling stress*): estrés causado por temperaturas comprendidas entre 0 °C y 15 °C
- Estrés por congelamiento o helada (*Freezing stress*): estrés causado por temperaturas debajo de 0 °C

El término “helada” tiene diferentes acepciones. Desde el punto de vista meteorológico, la helada se produce cuando la temperatura del ambiente

desciende por debajo de 0 °C. Desde el enfoque agrometeorológico, la helada se define como un descenso de la temperatura a niveles críticos para los cultivos, llegando a producir la muerte de los mismos. Existen otros criterios de clasificación para las heladas, como época de ocurrencia, origen climatológico, entre otros (Alarcón & Trebejo, 2010).

Como se mencionó anteriormente, desde el punto de vista agrometeorológico, la helada es una de las condiciones más dañinas para los cultivos (Barrientos *et al.*, 1994; Chen & Li, 1980; Vega & Bamberg, 1995; Gutiérrez, 2008), que dependerá no sólo de la intensidad del estrés, sino también de la duración y fase fenológica en la que se encuentre el cultivo (Alarcón & Trebejo, 2010). Generalmente la ocurrencia de eventos de helada es registrada en horas de la madrugada con una duración entre 1 a 2 horas (SENAMHI, 2010).

En el Perú, se ha identificado que las zonas más susceptibles a las bajas temperaturas se concentran principalmente en la zona Sierra (Figura 2) (CENEPRED, 2016), coincidiendo lamentablemente con la mayoría de las principales zonas de producción del cultivo de papa.

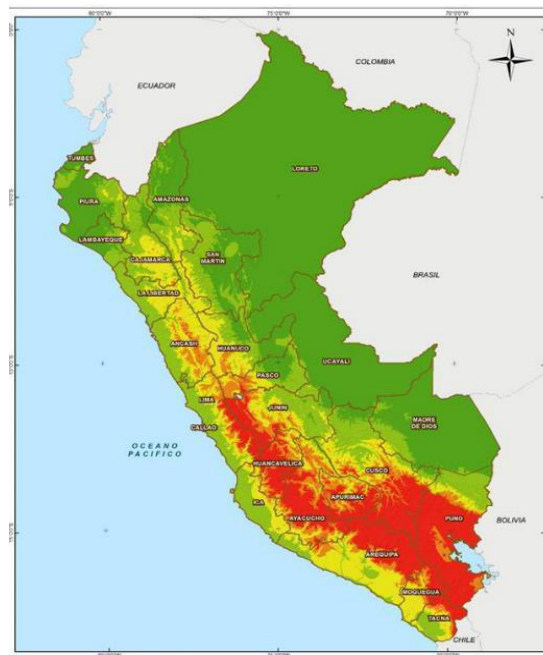


Figura 2. Mapa de zonas susceptibles a las bajas temperaturas según la intensidad de colores. Zonas rojas: altamente susceptibles. Zonas amarillas: medianamente susceptibles. Zonas verdes: mínimamente susceptibles. Fuente: CENEPRED, 2016

c. Efecto de las bajas temperaturas en las plantas

La exposición a estrés por helada produce efectos más severos en las células, que el estrés por frío, ya que el congelamiento desencadena la formación de hielo, provocando deshidratación excesiva pudiendo llegar hasta la muerte celular (Pearce, 1999).

La formación de hielo se inicia en los espacios intercelulares, debido a que el fluido extracelular tiene el punto de congelación más alto (menor concentración de solutos) que el fluido intracelular. Debido a que el potencial químico del hielo es menor que el del agua líquida, la formación del hielo extracelular resulta en la reducción del potencial hídrico fuera de la célula. Por lo tanto, tras ocurrir el movimiento del agua no congelada desde el interior hacia los espacios intercelulares, se inducirá a la deshidratación, la cual conllevará a la inactivación de enzimas responsables de procesos vitales, así como a la desnaturalización de proteínas; pudiendo llegar a culminar en la muerte celular (Pearce, 1999; Levitt, 1980).

La membrana celular es una bicapa lipídica que regula la entrada y salida de muchas sustancias entre el citoplasma y el medio extracelular y es la primera estructura afectada por la helada (Steponkus, 1984). Según Lynch & Steponkus (1978), durante el congelamiento, el flujo de agua de las células provoca contracción de las paredes celulares y de la membrana y, durante el deshielo, se produce la expansión de las mismas, siendo estas dos fuerzas las que causan la lisis del protoplasto y como consecuencia, pérdida de la integridad y colapso de la célula, traducido en la deshidratación celular.

La helada provoca una transición de fases en la membrana, induciendo a la rigidificación, disminución de la permeabilidad y fluidez (Sharma *et al.*, 2005; Shi *et al.*, 2015). La insaturación de los lípidos es considerada como uno de los puntos críticos en los mecanismos de tolerancia al estrés por frío (Nishida & Murata, 1996). La importancia de los ácidos grasos insaturados ha sido demostrada en mutantes de *Arabidopsis* (*fad2*, *fad5* y *fad6*), los cuales

presentaron bajas concentraciones de estos ácidos y, por ende, susceptibilidad a las bajas temperaturas (Hughly & Somerville, 1992; Miquel *et al.*, 1993). Vogg *et al.* (1998), reportaron que, al aumentar el contenido de ácidos grasos insaturados de las membranas, incrementó la fluidez de la misma.

Además de la deshidratación celular, existen otros factores que contribuyen al daño celular durante el congelamiento, como la desnaturalización de proteínas y producción de radicales libres (Guy *et al.*, 1998). Las principales especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS) son el superóxido y peróxido de hidrógeno. Las ROS desempeñan un papel significativo en la peroxidación lipídica (Zheng & Yang, 1991; Delong, 1998), hidrólisis de polisacáridos (Monk *et al.*, 1989) y degradación de ácidos nucleicos (Becana *et al.*, 1998) y proteínas (Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 1998). La formación del superóxido y peróxido de hidrógeno en los tejidos expuestos a la baja temperatura puede causar la peroxidación de los lípidos de la membrana, afectando su integridad y permeabilidad, llevando a la muerte celular (Purvis & Shewfelt, 1993; Wang, 1995).

Los cloroplastos son organelas sensibles a las bajas temperaturas (Nilsen & Orcutt 1996). La exposición a estas temperaturas promueve el cierre estomático con el fin de prevenir pérdidas de agua por transpiración, la fotoinactivación del fotosistema II (*photosystem*, PS II), y la reducción de la tasa fotosintética. Seppänen y Coleman, (2003) mostraron que la fotosíntesis de una variedad tolerante al congelamiento se redujo transitoriamente durante el evento de congelación mientras que *en S. tuberosum*, la reducción se incrementó, provocando daños irreversibles, como la muerte.

La medida de la fluorescencia clorofílica sirve como indicador del rendimiento del fotosistema II y ha sido útil, por ejemplo, para la identificación de plantas tolerantes al estrés salino (Percival & Fraser, 2001).

Espinoza (2017) evaluó el daño fotosintético a través de la medición de la fluorescencia utilizando un analizador de gases CI-340 (*Bio-Science*, Inc.),

exponiendo plantas de papa a 3 temperaturas: temperatura no congelante (4 °C) y temperaturas congelantes (0 °C y -4 °C) y, reportó daño fotosintético (incremento de la fluorescencia) en la variedad susceptible (*Solanum stenotomum*) tras la exposición a temperaturas congelantes (0 °C y -4 °C) a diferencia de la variedad tolerante (*Solanum goniocalyx*), la cual no evidenció daño fotosintético (fluorescencia constante) tras la exposición a ninguna de las temperaturas evaluadas, concluyendo que las temperaturas congelantes ejercerían daño sobre el aparato fotosintético.

Entre otros cambios inducidos por el estrés de bajas temperaturas, se deben mencionar la acumulación de proteínas hidrofílicas y azúcares, inducción de proteínas chaperonas y sistemas de secuestro de ROS (Sakai & Larcher, 1987; Mohapatra *et al.*, 1989; Hughes & Dunn, 1996; Palva & Heino, 1997; Thomashow, 1999).

Las plantas tienen dos estrategias principales para superar el estrés por helada: evitación o tolerancia. La evitación del congelamiento consiste en minimizar la presencia del estrés, el cual se logra por el sobreenfriamiento. En este caso, los líquidos pueden enfriarse por debajo de su temperatura de congelación, sin llegar a formar los cristales de hielo debido a la participación de las proteínas nucleadoras (Palva & Heino, 1997; Levitt, 1980). La tolerancia es la capacidad natural de resistir las alteraciones que ocasiona el estrés por helada a través de mecanismos internos. Cabe mencionar que la tolerancia al estrés puede incrementar si las plantas son expuestas a previos períodos de enfriamiento, conocidos como períodos de aclimatación. Sin embargo, no todos los cultivos pueden aclimatarse, entre ellos: la papa.

2.3 Secuenciamiento de RNA (RNA-Seq)

a. Transcriptoma

El transcriptoma es el conjunto completo de transcritos en una célula, para un estadio específico de desarrollo o condición fisiológica (Wang *et al.*, 2009) constituido por 1) RNA codificante: RNA mensajero (mRNA) y 2) RNA no codificante: RNA transportador (tRNA), RNA ribosomal (rRNA), RNA estructural

entre otros. El mRNA es la molécula intermediaria en la conversión de las secuencias de DNA en proteínas funcionales.

b. RNA-Seq

En las últimas décadas se ha incrementado el uso de enfoques transcriptómicos para el estudio de los principales mecanismos moleculares relacionados a tolerancia de estrés biótico y abiótico en diversas plantas. Las tecnologías de secuencias por etiquetas expresadas (*Expressed Sequence Tags*, EST) y los *microarrays*, fueron los primeros enfoques de alto rendimiento (Wolf, 2013).

El enfoque de EST se basa en la obtención de secuencias parciales a partir de una biblioteca de cDNA (colección de cDNA clonados), los cuales servirán como identificadores cortos de genes. Por otro lado, el *microarray* se basa en la hibridación de un único cDNA con sondas marcadas y es usada para medir la abundancia relativa de los transcriptos. Sin embargo, estas plataformas presentan limitaciones. La tecnología de EST presenta baja cobertura, limitando la detección de transcriptos de baja expresión, además de una alta tasa de error y alto costo (Wang *et al.*, 2013). Por otro lado, los *microarrays* dependen del conocimiento previo de las secuencias genómicas, tienen un alto costo por experimento, precisan de un gran número de sondas para aumentar su cobertura, además de su baja especificidad para la identificación de los transcriptos de baja abundancia (Jaksik *et al.*, 2015; Valdés *et al.*, 2013).

En los últimos años ha emergido un poderoso enfoque llamado secuenciamiento de RNA (RNA-Seq) superando las limitaciones de las tecnologías descritas anteriormente. El RNA-seq es una tecnología de secuenciación de nueva generación (*Next Generation Sequencing*, NGS) que se fundamenta en el secuenciamiento del cDNA.

La metodología del RNA-seq puede ser resumida de la siguiente manera: los fragmentos de RNA son convertidos en cDNA y, en seguida, son ligados a adaptadores en un extremo (*single-end*) o en ambos extremos de los fragmentos (*paired-end*). Cada molécula de cDNA es amplificada para ser luego secuenciada.

El tamaño de las secuencias generadas puede ser de 30 a 400 pares de bases, dependiendo de la plataforma de secuenciamiento utilizada (Wolf, 2013).

Las tecnologías NGS han evolucionado rápidamente, permitiendo el secuenciamiento de un gran número de genomas a través de diversas plataformas de tecnologías de secuenciación, las cuales difieren principalmente en la sensibilidad y el volumen de los datos generados, en los sistemas de detección química y costos (Ambardar *et al.*, 2016).

La primera tecnología de secuenciamiento fue desarrollada por la empresa 454 *Life Science* y luego absorbida por Roche denominada Secuenciamiento 454, tecnología basada en el pirosecuenciamiento. Esta tecnología se basa en la detección del pirofosfato liberado cada vez que se incorpora un nucleótido, provocando una reacción enzimática que emite luz, permitiendo así la detección de secuencias. Sin embargo, el uso de esta tecnología ha disminuido debido a su alto costo y baja cobertura (Jazayeri *et al.*, 2015).

A inicios del 2007, *Illumina* puso a disposición su nueva tecnología de secuenciamiento basada en el secuenciamiento por síntesis (*Sequencing by Synthesis*, SBS), implementada en las plataformas de secuenciamiento de alto secuenciamiento (*High Sequencing*, HiSeq) (Wang *et al.*, 2009). Este tipo de secuenciamiento consiste en la amplificación a través de una Reacción en Cadena de la Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) puente y utiliza el marcaje por fluorescencia de nucleótidos modificados como terminadores reversibles. Actualmente, es la plataforma más utilizada, debido a que se puede obtener un gran volumen de datos, con bajas tasas de error (Quail *et al.*, 2012) y a un menor costo por base (Johnson *et al.*, 2007; Varshney *et al.*, 2009).

Después del secuenciamiento, los millones de lecturas (*reads*) generadas deben ser ensambladas. Existen dos enfoques para realizar este ensamblaje (Wang *et al.*, 2009):

- Ensamblaje de *novο*: el ensamblaje no se apoya en ninguna informaci3n de secuencia previa. Generalmente se utiliza el secuenciamiento *Sanger*, con el fin de obtener *reads* m1s largos.
- Ensamblaje con genoma de referencia: el ensamblaje se realiza sobre un genoma de referencia

Ante el gran volumen de datos gen3micos, se ha visto necesario dise1ar y adaptar herramientas inform1ticas para analizar este tipo de datos, muchas de ellas de uso libre. Actualmente, ha incrementado el uso de herramientas bioinform1ticas dise1adas para ser trabajadas en sistemas operativos basados en el entorno GNU/LINUX. Uno de estos sistemas operativos es Ubuntu, el cual presenta una interfaz de f1cil acceso y manejo de los datos a trav1s del uso de comandos, los cuales son interpretados, ejecutados y visualizados en la misma ventana de ejecuci3n.

El RNA-seq se ha convertido en una herramienta de alta sensibilidad y costo-efectiva para analizar y entender el perfil cuantitativo del transcriptoma (Pinto *et al.*, 2011). Dentro de las principales ventajas del RNA-seq se puede mencionar: amplia cobertura, elevada sensibilidad para la identificaci3n y cuantificaci3n precisa de transcritos, incluyendo los de baja expresi3n y no s3lo aquellos depositados, por ejemplo, en un microarreglo (Chen *et al.*, 2007). Cuando se cuenta con un genoma de referencia, permite la identificaci3n de empalme alternativo (*splicing alternativo*). Sin embargo, tambi1n permite analizar especies prescindiendo de un genoma de referencia (Pinto *et al.*, 2011).

Hasta el momento se han realizado pocos estudios de la respuesta del transcriptoma ante el estr1s inducido por helada (temperaturas congelantes) utilizando RNA-seq, como los reportados en *Jatropha curcas* L. (Wang *et al.*, 2013), *Brassica napus* (Xu *et al.*, 2015), *Camellia sinensis* (Zheng *et al.*, 2015), *Solanum tuberosum* Group *Phureja* (Massa *et al.*, 2013) y *Solanum tuberosum* (Espinoza, 2017).

- c. An1lisis de la expresi3n diferencial de genes en papa en respuesta al estr1s por fr3o

Rensink *et al.* (2005a) emplearon ESTs a partir de bibliotecas de cDNA de papa expuestas a estrés salino, calor, frío y sequía, y revelaron la expresión de 1476 secuencias expresadas exclusivamente para estrés abiótico. Además, Rensink *et al.* (2005b) utilizaron *microarrays* de cDNA para estimar la expresión en plántulas crecidas bajo estrés de frío, calor o salino. En este estudio se reveló que los genes codificadores de factores de transcripción y factores de transducción implicados en la respuesta al estrés en papa fueron similares a los detectados en *Arabidopsis* y *Oryza sativa*, sugiriéndose la existencia de vías de respuestas similares entre las plantas.

Espinoza (2017) analizó el transcriptoma de una especie de papa nativa tolerante (*Solanum goniocalyx*) y una susceptible (*Solanum stenotomum*) seleccionadas por su respuesta contrastante al estrés por helada (-4 °C) con una previa aclimatación a una temperatura no congelante (4 °C), reportando como genes candidatos de tolerancia a helada, a los genes encargados de la percepción de la señal de estrés (fosfolipasa C, proteína de respuesta osmótica, β -glucosidasa), factores de transcripción (de la familia MYB, WRKY y de unión CRT 2 y 3) los cuales regulan la expresión de los genes COR (proteínas anticongelantes, LEA y desaturasas, *etc.*).

Como primer resultado de este trabajo, el año pasado reportamos la existencia de expresión diferencial génica tras el estrés por helada entre las dos variedades de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* (Martinez *et al.*, 2018).

Aunque se han identificado genes y vías relacionadas con la respuesta al estrés por helada, el presente estudio tiene por finalidad caracterizar el transcriptoma foliar de papas nativas de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*.

III. HIPÓTESIS

Existen diferencias en los niveles de expresión génica entre dos variedades de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*, Yana Manwa (variedad tolerante) y Yuraq Gaspar (variedad susceptible), tras la exposición al estrés por helada.

IV. OBJETIVOS

Objetivo General:

Caracterizar el transcriptoma foliar en dos variedades de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*, Yana Manwa (variedad tolerante) y Yuraq Gaspar (variedad susceptible), tras la exposición al estrés por helada.

Objetivos Específicos:

- Obtener y ensamblar el transcriptoma de dos variedades de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*, Yana Manwa (variedad tolerante) y Yuraq Gaspar (variedad susceptible), tras la exposición al estrés por helada.
- Cuantificar y evaluar la expresión génica de dos variedades de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*, Yana Manwa (variedad tolerante) y Yuraq Gaspar (variedad susceptible), tras la exposición al estrés por helada.
- Comparar e identificar genes diferencialmente expresados entre dos variedades de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*, Yana Manwa (variedad tolerante) y Yuraq Gaspar (variedad susceptible), tras la exposición al estrés por helada.
- Identificar genes candidatos asociados con la tolerancia al estrés por helada en dos variedades de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*, Yana Manwa (variedad tolerante) y Yuraq Gaspar (variedad susceptible),

V. MATERIAL Y MÉTODOS

Morales (2017) estandarizó y seleccionó la temperatura y el tiempo de muestreo basada en los resultados obtenidos por Espinoza (2017) con respecto al daño del aparato fotosintético a temperaturas congelantes y en los reportes de la frecuencia de helada en Perú (SENAMHI, 2010). Morales (2017) evaluó los siguientes parámetros fisiológicos: tasa fotosintética, tasa de transpiración y conductancia estomática, y reportó diferencias significativas de la respuesta fisiológica entre las dos variedades de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* bajo la condición de estrés seleccionada (- 8 °C por 1 hora).

5.1 Material biológico

Dos variedades de papas nativas de Huancavelica fueron seleccionadas: Yana Manwa (*Solanum tuberosum* subsp. *andigena*), como variedad tolerante a helada y Yuraq Gaspar (*Solanum tuberosum* subsp. *andigena*), como variedad susceptible a helada.

A continuación, se describen las principales características de las variedades utilizadas (Tabla 1):

Tabla 1. Características de las variedades de *S. tuberosum* subsp. *andigena*

	Tolerante	Susceptible
Género	<i>Solanum</i>	<i>Solanum</i>
Especie	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>andigena</i>	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>andigena</i>
Nombre común	Yana Manwa (YM)	Yuraq Gaspar (YG)
Ploidía	2n=4x=48	2n=4x=48
Altura	3 800 – 4 200 m.s.n.m.	3 400 – 4 000 m.s.n.m.
Hábito de crecimiento	Semi erecto	Decumbente
Color del tallo	Verde con muchas manchas	Verde

Fuente: CIP y FEDECH, 2006

Se realizó la propagación de las plántulas de papa a través de esquejes de tallos laterales, las cuales fueron regadas hasta su enraizamiento. Posteriormente, las plántulas fueron trasplantadas en 12 macetas con sustrato especial (Martinez, 2018) durante 3 meses bajo las condiciones descritas por Seppänen y Coleman (2003) (Figura 3).



Figura 3. Plántulas de las variedades de *S. tuberosum* subsp. *andigena*. Variedad tolerante (lado derecho) y Variedad susceptible (lado izquierdo).

5.2 Localización geográfica

Las plantas fueron propagadas a partir de tubérculos, en los invernaderos de la Universidad para el Desarrollo Andino (UDEA-Huancavelica) ubicados en el distrito de Lircay, región de Huancavelica ($12^{\circ}59'22''$ LS, $74^{\circ}43'14''$ LO) a una altura de 3 278 m.s.n.m., con temperaturas oscilando entre 2 °C y 18 °C.

5.3 Diseño experimental

Finalmente, se llevó a cabo la colecta de hojas considerando 2 tiempos de muestreo: Tiempo Control (antes del estrés, T0) y Tiempo Estrés (después del estrés a -8 °C por una hora, T1), con 3 repeticiones (R1, R2 y R3) para cada tiempo. Cada unidad experimental fue representada por una planta, obteniéndose en total 12 muestras: 2 variedades, colectadas en 2 tiempos con 3 repeticiones (Tabla 2)

Tabla 2. Códigos de las muestras colectadas de *S. tuberosum subsp. andigena* de la variedad tolerante y susceptible para la extracción de RNA.

Variedad	Tiempo de muestreo	Repetición	Código
Yana Manwa (YM) (tolerante)	Control	1	YMT0R1
		2	YMT0R2
		3	YMT0R3
	Estrés	1	YMT1R1
		2	YMT1R2
		3	YMT1R3
Yuraq Gaspar (YG) (susceptible)	Control	1	YGT0R1
		2	YGT0R2
		3	YGT0R3
	Estrés	1	YGT1R1
		2	YGT1R2
		3	YGT1R3

5.4 Inducción del estrés

Finalmente, luego de 12 semanas de desarrollo, las plantas fueron sometidas a estrés por temperatura, el cual consistió en la simulación de congelación a -8 °C por una hora del material biológico usando una cámara de temperatura controlada (INDUMELAB, Modelo OPCa-D-120) ubicada en UDEA. Las muestras colectadas fueron conservadas en nitrógeno líquido hasta su uso, en el laboratorio de la Unidad de Genómica de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

5.5 Extracción de RNA

Para la extracción del RNA se utilizó el TRIzol Reagent (Invitrogen™, Life Technologies) según las indicaciones del proveedor (Anexo 1). TRIzol Reagent es un reactivo listo para usar, utilizado para el aislamiento de RNA a partir de células

y tejidos, el cual mantiene la integridad del RNA durante la homogeneización de los tejidos, y al mismo tiempo rompe las células y componentes celulares del tejido vegetal. El RNA se aisló a partir de 1 - 2 g de hojas por muestra, aproximadamente. Luego, las muestras fueron tratadas con el kit *DNase* (Ambion®, DNA-free) para eliminar los restos de DNA genómico (Río *et al.*, 2010).

Se utilizó la relación de absorbancias A260/A280 para evaluar el grado de pureza del RNA extraído. La concentración del RNA fue evaluada en un espectrofotómetro *Eppendorf*® y la integridad del RNA obtenido por medio de geles de agarosa al 2% (90V por 45 min aproximadamente).

Finalmente, se diluyeron las muestras en alícuotas de 50 ng de RNA total en un volumen de 50 µL de agua libre de RNase (*Diethyl pyrocarbonate*, DEPC), listas para enviar al servicio de secuenciamiento.

5.6 Secuenciamiento de RNA

La construcción y el secuenciamiento de las bibliotecas se realizaron en el laboratorio *Microarray Clinical Core* de la Universidad de California, Los Angeles (UCLA). La construcción de cada una de las bibliotecas (conversión del RNA total en bibliotecas de cDNA) se realizó con el kit *KAPA Stranded mRNASeq*. En primer paso se mezcló el RNA total eluído en 50 µL de agua libre de nucleasas (*nuclease free water*, NFW) con perlas magnéticas y el buffer de unión a las perlas magnéticas (*beads*). Luego, la solución se sometió a desnaturalización en altas temperaturas, permitiendo la unión de las perlas magnéticas, ligadas a moléculas poli-T, con la cola poli-A del mRNA (característica exclusiva del mRNA). De esta manera, todo el sobrenadante se removió y las moléculas del RNAr y demás contaminantes fueron descartadas, quedando sólo el mRNA. Finalmente, se realizó un lavado con el buffer de lavado para la separación del mRNA de los *beads*.

Después de la purificación, el mRNA se cortó en pequeños fragmentos, por medio de cationes divalentes de magnesio a temperatura elevada (95 °C). Posteriormente, se realizó la conversión de la primera hebra de cDNA usando

transcriptasa reversa y cebadores al azar (*random primers*), contenidos en el buffer de síntesis de cDNA. En seguida se realizó la síntesis de la segunda hebra, a través de la conversión del cDNA:RNA a una doble cadena cDNA (*double strand cDNA*, dscDNA) con la mezcla de enzimas para síntesis de la segunda cadena de cDNA y el marcaje, se realizó incorporando desoxiuridina trifosfato (*deoxyuridine triphosphate*, dUTP) a la segunda cadena de cDNA.

Con el fin de obtener una eficiente ligación de los adaptadores, los fragmentos de cDNA se sometieron a un proceso de reparación en las extremidades 5' y 3'. Por otro lado, para evitar o reducir la formación de quimeras generadas por la unión de los fragmentos de cDNA, se realizó una rápida adenilación de los extremos 3' de los fragmentos de cDNA de doble cadena (dscDNA). Posteriormente, se realizó la ligación de los adaptadores, los cuales poseen una timina en el extremo 3', complementaria a una adenina del fragmento molde, que están fijados en una superficie sólida llamada célula de flujo (*flow cell*).

Finalmente, para la construcción de la biblioteca de cDNA, los productos fueron purificados y enriquecidos a través de la amplificación por PCR en puente (*bridge PCR*). Los moldes ligados a los adaptadores de los fragmentos de cDNA actuaron como iniciadores originando puentes que favorecieron la amplificación en presencia de nucleótidos no marcados y de la enzima polimerasa. Los amplicones quedaron adheridos y, después de la desnaturalización, formaron un nuevo puente permitiendo la amplificación, proceso que se repitió sucesivamente, generando millones de grupos de un determinado fragmento.

Un *flow cell* conteniendo los grupos de fragmentos formados se colocaron en el secuenciador *HiSeq3000*, donde se produjo una nueva desnaturalización para dar inicio a ciclos automatizados de extensión. Los nucleótidos marcados con fluoróforos reversibles son introducidos en la reacción, estos nucleótidos tienen propiedades de terminación, lo que permite parar la síntesis de DNA cuando la DNA polimerasa integra el correspondiente nucleótido en la cadena naciente. Una vez integrado el nucleótido, el láser activa los fluoróforos, emitiendo una luz diferencial según el tipo de nucleótido incorporado. Una vez terminado el proceso,

los nucleótidos no integrados son retirados y se remueve enzimáticamente el terminador para que un nuevo ciclo permita la incorporación del siguiente nucleótido (Murata, 2013).

Se realizó el secuenciamiento usando la plataforma *Illumina HiSeq 3000* del tipo single-end, utilizando un modo de lectura de 50 pb. El secuenciador *HiSeq3000* (*Illumina*) adopta la tecnología de secuenciamiento por SBS. Esta tecnología permite realizar el secuenciamiento paralelo en masa, de millones de fragmentos utilizando un método basado en un terminador reversible que detecta bases únicas cuando son incorporados en las cadenas de DNA en crecimiento.

5.7 Análisis bioinformático

Para el análisis bioinformático se utilizó el protocolo establecido para una data obtenida del secuenciamiento en una plataforma *Illumina* con genoma de referencia (Trapnell *et al.*, 2012). Este análisis fue realizado bajo el sistema operativo LINUX (UBUNTU versión 14.04).

a. Control de calidad de secuencias

Los *reads* en crudo, obtenidos del secuenciamiento, fueron analizados y evaluados cualitativamente (calidad de cada base nucleotídica, tamaño de las lecturas, porcentaje de GC) a través del programa FastQC versión 0.11.2 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>).

Se verificó el valor de calidad (*Phred score*, Q) siendo $Q = -10\log_{10}(P)$, donde P es la probabilidad de que la base sea errónea. Por ejemplo, un *Phred score*=10, indicaría una probabilidad de identificación incorrecta de 1 en 10 bases (exactitud del 90%) y, un *Phred score*=30 indicaría una probabilidad en la identificación incorrecta de 1 en 1000 bases (exactitud del 99.9%) (Ewing & Green, 1998).

Además, con este software se evaluaron otros parámetros como longitud de las secuencias, porcentaje de contenido de Guanina+Citosina (%GC) de cada base, secuencias duplicadas, secuencias sobreexpresadas entre otros.

Para la visualización de la calidad de las secuencias de cada una de las bibliotecas, se utilizó el siguiente comando:

```
$ fastqc [nombre de la biblioteca]
```

Tras la evaluación de calidad de cada una de las bibliotecas, se optó por la remoción y/o recorte de los adaptadores del secuenciamiento y bases de baja calidad con el programa FastX (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/), a través de los siguientes comandos:

- i) Para eliminar las secuencias de los adaptadores se utilizó el siguiente comando:

```
fastx_clipper -a <secuencia del adaptador a remover> -l <descartar secuencias más cortas que> -i <nombre de la biblioteca> -o <nombre del archivo de salida>
```

- ii) Para recortar lecturas de baja calidad se utilizó el siguiente comando:

```
fastx_trimmer -f <primera base a mantener> -l <último base para mantener> -i <nombre de la biblioteca de entrada> -o <nombre del archivo de salida>
```

Ejemplo:

```
fastx_trimmer -f5 -l50 -i /media/sdc/Secuencias_RNA-Seq/YGT0R1_S13_L003_R1_001.fastq -o YGT0R1R1out.fastq
```

- iii) Para filtrar lecturas, se utilizó el mismo criterio utilizado por Murata (2017): remoción de lecturas de longitud menor a 50 pb y con calidad menor a 25 en más del 50% de sus bases por biblioteca, a través del siguiente comando:

```
$ fastq_quality_filter -q 25 -p 50 -i <nombre de la biblioteca>
```

b. *Alineamiento de secuencias contra el genoma de referencia*

Después de la evaluación de la calidad de las secuencias, los *reads* se alinearon sobre la última versión del genoma de papa doble monoploide *S. tuberosum* Group *Phureja* DM1-3 516R44 (genoma de referencia), secuenciado por el Consorcio del Secuenciamiento del Genoma de la Papa (*Potato Genome*

Sequencing Consortium, PGSC) disponible en <http://www.potatogenome.net>, utilizando el programa Bowtie versión 2.2.3.0.

Bowtie2 es un alineador de secuencias ultra rápido, de alto rendimiento y usa la memoria de la máquina para alinear las pequeñas secuencias a grandes genomas. Este programa utiliza un algoritmo de retroceso con reconocimiento de calidad (*quality-aware backtracking algorithm*), el cual permite la presencia de bases desapareadas (*mismatches*) entre el genoma de referencia y las lecturas a ser alineadas. Además, este algoritmo favorece los alineamientos de alta calidad (Langmead *et al.*, 2009).

Para esta actividad se utilizó el siguiente comando:

```
$bowtie2-build <genoma de referencia> <nombre del índice del genoma>
```

Ejemplo:

```
$ bowtie2 – build genome.fa genoma
```

Se generaron 6 archivos:

```
bt2_PotatoGenome.1.bt2
```

```
bt2_PotatoGenome.2.bt2
```

```
bt2_PotatoGenome.3.bt2
```

```
bt2_PotatoGenome.4.bt2
```

```
bt2_PotatoGenome.rev.1.bt2
```

```
bt2_PotatoGenome.rev.2.bt2
```

Sin embargo, Bowtie2 no permite alineamientos entre un *read* y el genoma de referencia en presencia de grandes vacíos (*gaps*), por ende, no es posible alinear *reads* originados por la unión generada de la exclusión de intrones.

Las lecturas que no fueron alineadas con Bowtie, se procesaron con el programa TopHat versión 2.0.4. TopHat usa a Bowtie como un “motor” de alineamiento y fragmenta *reads*, que el Bowtie no logró alinear. Utilizando la información inicial del alineamiento, TopHat construye una base de datos con los posibles sitios de empalme (*splicing*) en el transcriptoma, sin conocimiento de un gen a priori, capacidad crucial para el descubrimiento de nuevos eventos de *splicing* (Trapnell *et al.*, 2010).

Para ello, se utilizó el siguiente comando_

```
$tophat2 -p <capacidad de procesamiento> -i <longitud mínima del intrón> -l  
<longitud máxima del intrón> -o <nombre del archivo de salida> <nombre del  
archivo de entrada en formato .fastq >
```

Ejemplo:

```
tophat2 -p 3 -i 10 -l 15000 -o tYGT0R1R1  
/media/sdb/tophat_diana/DATABASE/genome /media/sdc/Secuencias_RNA-  
Seq/fastx/YGT0R1R1out.fastq
```

c. Análisis de la expresión diferencial de genes

Los archivos de alineamiento generados de cada biblioteca en formato *.bam* se utilizaron como archivo de entrada (*input*) para el programa Cufflinks versión 2.0.2 (Trapnell *et al.*, 2010), disponible en el sitio: <http://cufflinks.cbcb.umd.edu/>.

Cufflinks fue utilizado para el montaje y la cuantificación de los transcritos. Con el fin de minimizar los efectos no relacionados a la diferencia entre las condiciones experimentales, los transcritos fueron normalizados, ya que se debe tener en cuenta, que dentro de las bibliotecas existen secuencias con mayor tamaño que otras. Debido a ello, pueden estar formados por una mayor cantidad de *reads*, lo cual no significa sobreexpresión con respecto a sus pares de menor tamaño con el mismo nivel de expresión.

La normalización puede ser representada por medio de cantidades transformadas como las lecturas por kilobase de transcrito RPKM (*Reads per Kilobase of transcript per million fragments mapped*) (Mortazavi *et al.*, 2008) o, la variación del RPKM denominada FPKM (*Fragments per Kilobase of transcript per million fragments mapped, FPKM*) o fragmentos por kilobase de transcrito (para la utilización en secuenciamiento con *reads* en *paired-end*) (Trapnell *et al.*, 2010).

Por lo tanto, el valor de RPKM fue la medida de la abundancia relativa del transcrito, calculado por la siguiente fórmula (Mortazavi *et al.*, 2008):

$$RPKM = 10^9 * C / N * L$$

C= Total de *reads* mapeadas

N = número total de lecturas mapeadas en 1 muestra

L = Tamaño del gen en pares de bases

$10^9 = 10^3 \text{ pares de base} * 1.000.000 \text{ de reads}$

Para ejecutar el comando de Cufflinks, se necesitaron los siguientes archivos: archivo del genoma de referencia en formato fasta (*.fa*) para el ensamblaje de las lecturas y el archivo de anotación del genoma de referencia (archivo en formato *gff*), en el cual se encuentra la descripción de la posición de las secuencias de los genes en el genoma de referencia (Espinoza, 2017).

Se utilizó el siguiente comando:

```
$cufflinks -o <nombre del archivo de salida> -p <capacidad de procesamiento> -g  
<archivo de anotación en formato .gff> -b <archivo de secuencia del genoma de  
la papa en formato .fa> <lecturas alineadas en formato .bam>
```

Ejemplo:

```
cufflinks          -o          YGT0R1R1cl          -p          5          -g  
/media/sdb/tophat_diana/DATABASE/PGSC_DM_V403_genes.gff          -b  
/media/sdb/tophat_diana/DATABASE/genome.fa  
/media/sdb/tophat_diana/DATABASE/tYGT0R1R1/accepted_hits.bam
```

Para ensamblar los transcritos en un solo archivo, se utilizó el programa Cuffmerge. El principal objetivo de este *script* es crear un archivo de montaje requerido por el siguiente programa a usar (Cuffdiff). Antes de ejecutar el comando de Cuffmerge, se creó un archivo llamado "*Assemblies*" (en formato *.txt*), el cual contiene todos los archivos del ensamblaje de los transcritos de cada una de las bibliotecas en formato *gff* obtenidos con Cufflinks. Luego se utilizó el siguiente comando:

```
$cuffmerge -o <nombre del archivo de salida> -p <capacidad del procesamiento>  
-g <archivo de anotación en formato .gff> -s <archivo de secuencia del genoma  
de la papa> <archivo del ensamblaje de todos los transcritos en formato .txt>
```

Ejemplo:

```
cuffmerge -o GTFmerge_screen -p 8 -g  
/media/sdb/tophat_diana/Genome/PGSC_DM_V403_genes.gff -s  
media/sdb/tophat_diana/DATABASE/genome.fa Assemblies.txt
```

Con el fin de calcular los cambios en la expresión de los transcritos entre las condiciones evaluadas en ambas variedades, se utilizó la herramienta Cuffdiff versión 2.2.1.

Cuffdiff asume que el cambio en la expresión de un transcrito puede ser medido a través del conteo de los *reads* o fragmentos generados (Trapnell *et al.*, 2013). Cuffdiff permitió evaluar el cambio de la expresión génica a través de la relación logarítmica en base 2 de la expresión tras el estrés/expresión en el tiempo control ($\log_2 T1/T0$) para ambas variedades. El cambio en la expresión de cada gen o transcrito es reportado con su correspondiente nivel de significancia estadístico representado por el valor p ajustado (*p-value*).

Para ejecutar Cuffdiff se utilizó el siguiente comando:

```
$cuffdiff -o <archivo de salida> -b <archivo de secuencia del genoma de la papa  
en formato .fa> -p <capacidad de procesamiento> -u <archivo formato .gtf>  
<archivos en formato .bam por cada variedad>
```

Ejemplo:

```
cuffdiff -o DiffYG -b /media/sdb/tophat_diana/Genome/genome.fa -p 8 -u  
/media/sdb/tophat_diana/cufflinks/GTFmerge_screen/merged.gtf /  
../tophat/tYGT0R1R1/accepted_hits.bam,..../tophat/tYGT0R1R2/accepted_hits.bam,  
../tophat_diana/tophat/tYGT0R2R1/accepted_hits.bam,..../tophat/tYGT0R2R2/acce  
pted_hits.bam,..../tophat_diana/tophat/tYGT0R3R1/accepted_hits.bam,..../tophat_dia  
na/tophat/tYGT0R3R2/accepted_hits.bam  
../tophat_diana/tophat/tYGT1R1R1/accepted_hits.bam,..../tophat_diana/tophat/tYG  
T1R1R2/accepted_hits.bam,..../tophat_diana/tophat/tYGT1R2R1/accepted_hits.ba  
m,..../tophat_diana/tophat/tYGT1R2R2/accepted_hits.bam,..../tophat_diana/tophat/tY  
GT1R3R1/accepted_hits.bam,..../tophat_diana/tophat/tYGT1R3R2/accepted_hits.b  
am
```

El cambio de expresión (*fold change*) será considerado como significativo si el *p-value* de ese gen es menor a 0.05 ($p < 0.05$), es decir, sólo un 5% de probabilidad de inferir falsos positivos. Aquellos genes con cambio de expresión significativa fueron denominados como genes diferencialmente expresados (*Differentially Expressed Genes*, DEGs). Dentro de este grupo de genes, a aquellos con valor de *fold change* mayor a 2, se les considerará como genes sobreexpresados y aquellos con valor de *fold change* < -2 serán los genes reprimidos.

Para la visualización gráfica de la distribución general de los datos en relación a los niveles de expresión, el programa R v3.1.1 disponible en <http://www.r-project.org/> fue usado para la construcción de los diagramas de densidades de datos.

5.8 Enriquecimiento funcional

Con el objetivo de mejorar la comprensión de los aspectos moleculares involucrados en la respuesta al estrés, se realizó el enriquecimiento funcional utilizando la ontología GO (ontología génica) a través del programa Blast2GO disponible en <http://www.blast2go.org> (Conesa & Götz, 2008).

Este programa permitió la categorización de los DEGs de acuerdo a su funcionalidad agrupándolos en 3 categorías: Procesos Biológicos (*Biological Process*, BP), Función Molecular (*Molecular Function*, MF) y Componente Celular (*Cellular Component*, CC).

El programa Blast2GO utilizó los términos GO para realizar las anotaciones funcionales:

- i) Blast: primero se realizó el alineamiento de las secuencias de los genes candidatos utilizando el algoritmo del BLAST con el fin de encontrar secuencias homólogas.
- ii) Mapeo: luego, las secuencias alineadas a los genes candidatos fueron mapeadas con el fin de obtener los términos GO.
- iii) Anotación: por último, se obtuvieron las anotaciones funcionales de los genes candidatos.

VI. RESULTADOS

6.1 Evaluación de las respuestas fisiológicas

Se observaron diferencias en la respuesta fisiológica entre las variedades de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* evaluadas. La variedad Yana Manwa no mostró variación significativa en los parámetros evaluados (tasa de fotosíntesis, tasa de transpiración y conductancia estomática) antes y después del estrés por helada. Sin embargo, la variedad Yuraq Gaspar mostró reducción significativa en los parámetros evaluados tras el estrés por helada (Morales, 2017).

6.2 Extracción de RNA

Las concentraciones del RNA extraído a partir de hojas de ambas variedades de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* fueron mayor a 300 ng/μL. Las relaciones A260/280 estuvieron dentro del rango de 1.8 y 2.0, lo que corresponde a muestras de RNA puro, sin contaminación de proteínas (Tabla 3).

Tabla 3. Concentraciones y relación de absorbancia de RNA total obtenido a partir de hojas de dos variedades de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*.

Muestra	ng/μL	A260/A280	Muestra	ng/μL	A260/A280
YMT0R1	919.7	2.08	YGT0R1	980.2	2.04
YMT0R2	916.2	1.94	YGT0R2	860.7	2.05
YMT0R3	672.3	2.01	YGT0R3	612.6	2.04
YMT1R1	585.7	2.07	YGT1R1	495.5	1.96
YMT1R2	749.1	2.05	YGT1R2	890.3	2.03
YMT1R3	584.2	2.05	YGT1R3	342.7	1.98

Se observaron las bandas de las subunidades del RNA ribosomal (25S, 18S y 5S), confirmando la obtención del material de RNA adecuado para realizar el secuenciamiento (Figura 4).

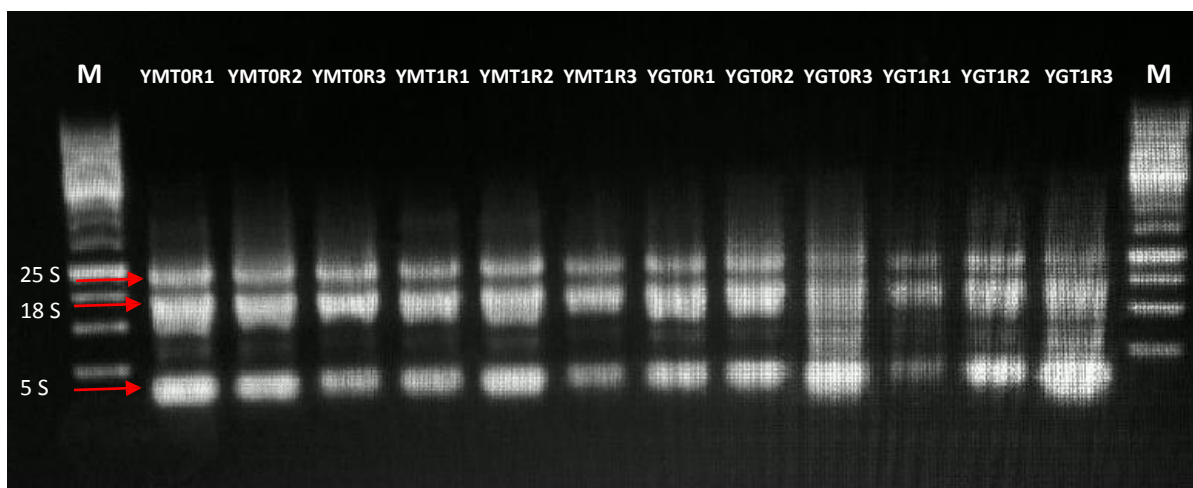


Figura 4. Corrida electroforética en gel de agarosa del RNA extraído. M: marcador de tamaño molecular 1kb, 25S, 18S y 5S: bandas de las subunidades ribosomales, YM: Yana Manwa (variedad tolerante), YG: Yugaq Gaspar (variedad susceptible), T0: tiempo control, T1: tiempo estrés, R1, R2 y R3: repetición 1, repetición 2 y repetición 3, respectivamente,

6.3 Secuenciamiento de RNA

Se obtuvieron un total de 12 bibliotecas, las cuales se secuenciaron en la plataforma Illumina Hi-Seq™ 3000 obteniendo lecturas *single-read* de 50 pares de bases (*base pairs*, bp).

6.4 Análisis bioinformático

El secuenciamiento de las bibliotecas generó más de 242 millones de lecturas en total (Tabla 4).

Tabla 4. Codificación de las bibliotecas y número total de lecturas generadas en las dos variedades de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*.

Variedad	Nombre de la biblioteca	Total de lecturas
Tolerante	YMT0R1.fastq	18 684 125
	YMT0R2.fastq	16 686 012
	YMT0R3.fastq	18 407 141
	YMT1R1.fastq	21 854 530
	YMT1R2.fastq	24 960 517
	YMT1R3.fastq	14 842 723
Susceptible	YGT0R1.fastq	19 985 121
	YGT0R2.fastq	18 419 288
	YGT0R3.fastq	23 784 532
	YGT1R1.fastq	18 233 672
	YGT1R2.fastq	23 126 280
	YGT1R3.fastq	23 609 446
TOTAL		24 2593 387

a. Control de calidad de secuencias

Finalizado el secuenciamiento, se procedió a analizar la calidad de las secuencias, a través del programa FastQC (Schmieder & Edwards, 2011).

La Figura 5 mostró una visión general de la calidad de las secuencias de una de las bibliotecas a lo largo de las bases. En el eje de las abscisas, tenemos la posición en pares de bases (pb), y en el eje de las ordenadas, el valor de la calidad en escala *Phred score*. El color de fondo del gráfico divide el eje Y en zonas según la calidad de las secuencias: muy buena calidad (zona verde), de

calidad razonable (zona amarilla) y de mala calidad (zona roja).

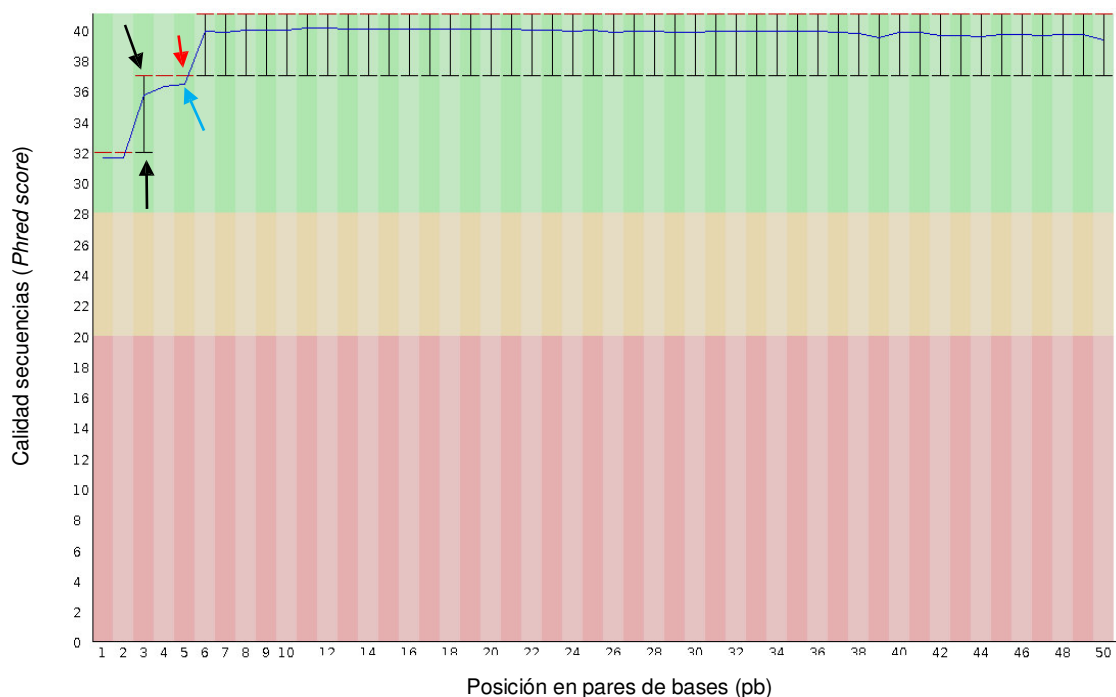


Figura 5. Valor de la calidad por base de la biblioteca YMT0R2. En el eje X, para cada posición de pb hay un diagrama de caja (*box plot*) en el cual la línea roja (flecha roja) representa la mediana de la calidad, las líneas superior e inferior del diagrama de caja (flechas negras) representan los percentiles 10% y 90%, la línea azul (flecha celeste) representa la calidad media. El eje Y está dividido en 3 zonas según la calidad de las secuencias: muy buena (color verde), calidad razonable (color amarillo) y mala calidad (zona roja).

En el programa FastQC se estimó la calidad de todas las secuencias resultantes del secuenciamiento a través del valor del *Phred Score*. Los valores de calidad fueron óptimos ya que se encontraron por encima del valor de 30 (Figura 5), es decir que la probabilidad de determinar una base errada sería de 1 por cada 1 000 pb (Ewing & Green, 1998), por lo que no se tuvo la necesidad de descartar secuencias.

El porcentaje medio en contenido de GC obtenidos en el presente estudio osciló entre 41% a 43%, no reportándose sobrerrepresentación de bases. Por lo tanto,

no fue necesario filtrar las secuencias en base a la calidad. Luego, las lecturas fueron procesadas para eliminar adaptadores y/o fragmentos de largo menor a 50 pb. Sin embargo, al aplicar los comandos correspondientes, no disminuyó el número de lecturas generadas.

b. Alineamiento de secuencias contra el genoma de referencia

Una vez verificada la calidad de las bibliotecas, se realizó el alineamiento de las lecturas utilizando los programas TopHat y Bowtie. Tras el alineamiento, se obtuvo una carpeta con los siguientes archivos de salida:

- *accepted_hits.bam*: archivo con los alineamientos de las lecturas mapeadas en formato binario (BAM). El formato *bam* es el archivo compactado de Secuencia Alineada/Mapeada (*Sequence Alignment/Map format*, SAM).
- *junctions.bed*: archivo que contiene las uniones de exón.
- *insertions.bed* y *deletions.bed*: archivo que contiene las inserciones y delecciones.
- *prep_reads.info*: archivo de control de preparación de lecturas previo al mapeo tophat.
- *align_summary.txt*: archivo que contiene el resumen del alineamiento (número de lecturas, número de lecturas mapeadas, % mapeo).
- *directorio.logs*: archivo donde se encuentran los pasos del proceso.
- *unmapped.bam*: archivo binario donde se encuentran las lecturas no mapeadas.

Según el alineamiento, las lecturas fueron clasificadas de la siguiente manera (Tabla 5):

- Lecturas mapeadas, dentro de este grupo se encontraron:
 - Lecturas únicas; es decir, lecturas que mapearon en un único sitio en el genoma de referencia, obteniéndose porcentajes de mapeo entre el 70.7% y 78.9%.
 - Lecturas múltiples; es decir, lecturas que mapearon en más de un sitio en el genoma de referencia, obteniéndose porcentajes de mapeo entre el

6.2% y 11.3%.

- Lecturas no mapeadas, obteniéndose porcentajes de mapeo entre el 14.1% y 21.1%.

Tabla 5. Distribución de los tipos de lecturas según mapeo al genoma de referencia (DM1-3 516R44).

MUESTRA	TOTAL LECTURAS	LECTURAS MAPEADAS				LECTURAS NO MAPEADAS	%
		LECTURAS ÚNICAS	%	LECTURAS MÚLTIPLES	%		
YMT0R1	18 684 125	14 737 290	78.9	1 174 451	6.3	2 772 384	14.8
YMT0R2	16 686 012	12 744 882	76.4	1 182 435	7.1	2 758 695	16.5
YMT0R3	18 407 141	13 966 757	75.9	1 500 231	8.2	2 940 153	16
YMT1R1	21 854 530	15 560 426	71.2	1 961 387	9	4 332 717	19.8
YMT1R2	24 960 517	19 595 566	78.5	1 852 829	7.4	3 512 122	14.1
YMT1R3	14 842 723	11 120 764	74.9	1 201 874	8.1	2 520 085	17
YGT0R1	19 985 121	14 269 377	71.4	2 230 909	11.2	3 484 835	17.4
YGT0R2	18 419 288	13 098 234	71.1	1 504 559	8.2	3 816 495	20.7
YGT0R3	23 784 532	17 570 905	73.9	1 466 035	6.2	4 747 592	20
YGT1R1	18 233 672	13 337 032	73.2	1 705 162	9.4	3 191 478	17.5
YGT1R2	23 126 280	16 720 300	72.3	2 607 564	11.3	3 798 416	16.4
YGT1R3	23 609 446	16 685 034	70.7	1 929 355	8.22	4 995 057	21.1
TOTAL	242 593 387	179 406 567		20 316 791		42 870 029	

c. Análisis de la expresión diferencial de genes

Con el fin de examinar la expresión diferencial de los genes, se realizaron gráficos de tipo volcán (*volcano plot*) para la variedad tolerante y susceptible, utilizando el software RStudio. El *volcano plot* es un diagrama de dispersión, ubicándose en el eje de las abscisas, el valor del *fold change* en una escala logarítmica en base 2 de cada gen y en el eje de las ordenadas, la significancia estadística basada en una escala logarítmica negativa en base 10 del *p-value*. Aquellos genes

representados como puntos grises en ambos *volcano plots*, corresponden a genes que no variaron su expresión significativamente ($-2 < \log_2 \text{fold change} < 2$ y $-\log_{10}(p\text{-value}) > 0.05$), mientras que aquellos genes expresados significativamente (DEGs) fueron representados en los *volcano plots* como puntos rojos o azules para la variedad tolerante y susceptible, respectivamente (Figuras 6 y 7).

Se pueden observar más DEGs en la variedad tolerante (Figura 6) versus la variedad susceptible (Figura 7), reportándose un total de 383 DEGs, de las cuales 279 DEGs fueron de la variedad tolerante y 160 DEGs de la variedad susceptible. Esta diferencia numérica mostraría que ambas variedades evaluadas presentan una notable diferencia en la respuesta al estrés por helada.

Con respecto a la modulación de los DEGs, se observa como puntos rojos a los DEGs modulados positivamente o sobreexpresados ($\log_2 \text{fold change} > 2$ y $-\log_{10}(p\text{ value}) < 0.05$) y a los DEGs modulados negativamente o reprimidos ($\log_2 \text{fold change} < -2$ y $-\log_{10}(p\text{ value}) < 0.05$) como puntos azules. Se reporta un mayor número de DEGs modulados positivamente en la variedad tolerante y un mayor número de DEGs modulados negativamente en la variedad susceptible (Figuras 6 y 7).

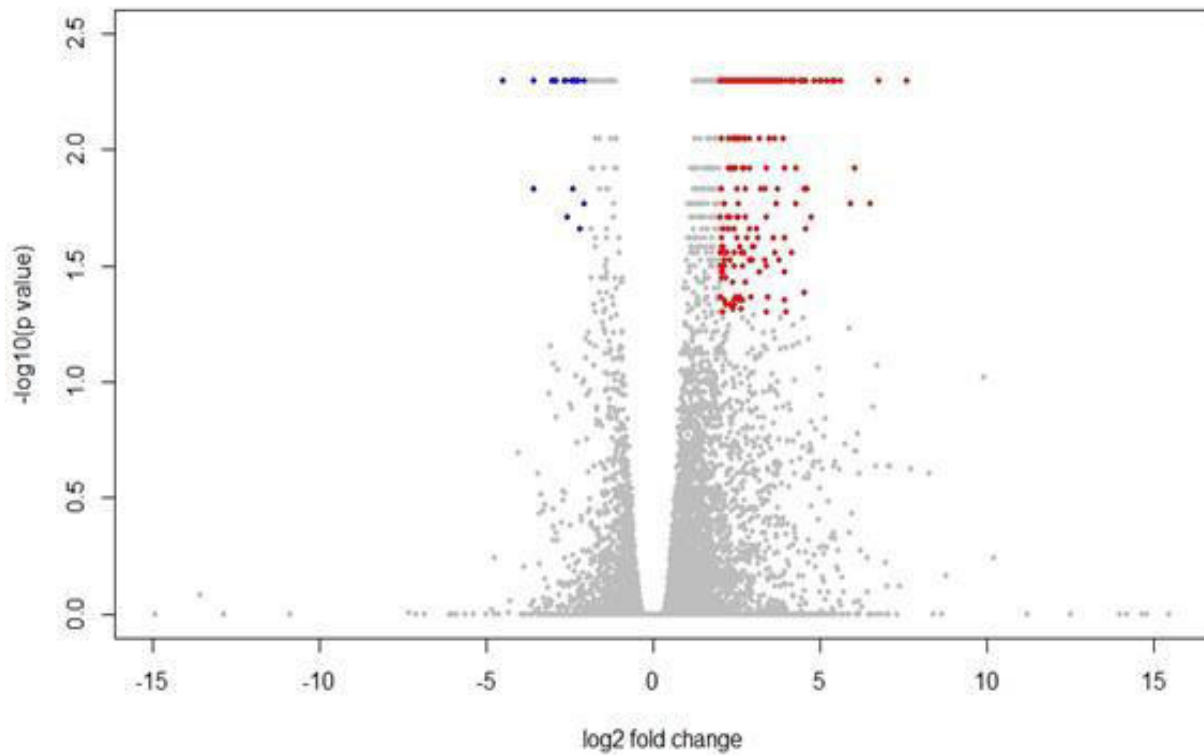


Figura 6. Volcano Plots. Análisis de la expresión de genes de Yana Manwa (variedad tolerante) tras el estrés por helada. Cada gen está representado por un punto, la posición espacial está dada por su cambio de expresión ($\log_2 \text{fold change}$) y significancia estadística ($-\log_{10} p \text{ value} < 0.05$).

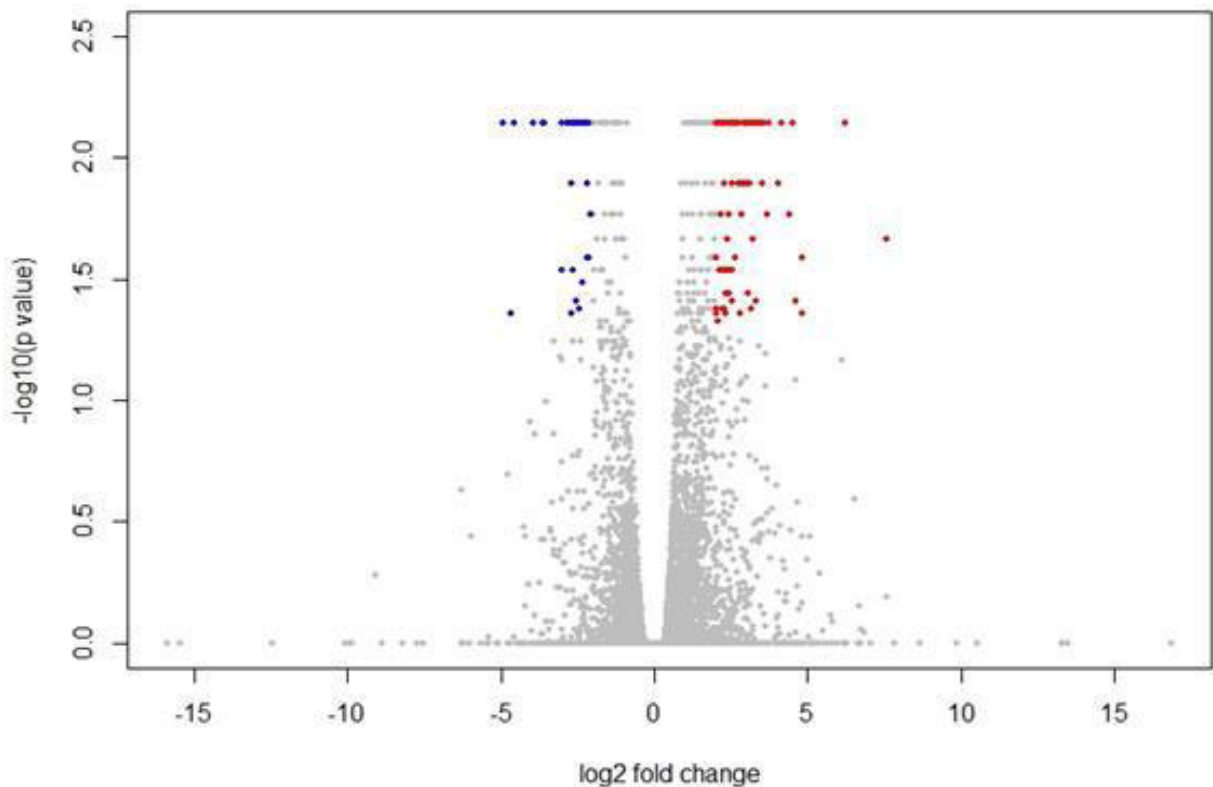


Figura 7. Volcano Plots. Análisis de la expresión de genes de Yuraq Gaspar (variedad susceptible) tras el estrés por helada. Cada gen está representado por un punto, la posición espacial está dada por su cambio de expresión ($\log_2 \text{fold change}$) y significancia estadística ($-\log_{10} p \text{ value} < 0.05$)

La visualización de los DEGs exclusivos y comunes se realizó a través de un diagrama de Venn. Se identificaron 223 DEGs exclusivos para la variedad tolerante y 104 DEGs exclusivos para la variedad susceptible, y sólo 56 DEGs comunes para ambas variedades (Figura 8), lo que indicaría que las respuestas transcriptómicas en gran parte son genotipo-específicas.

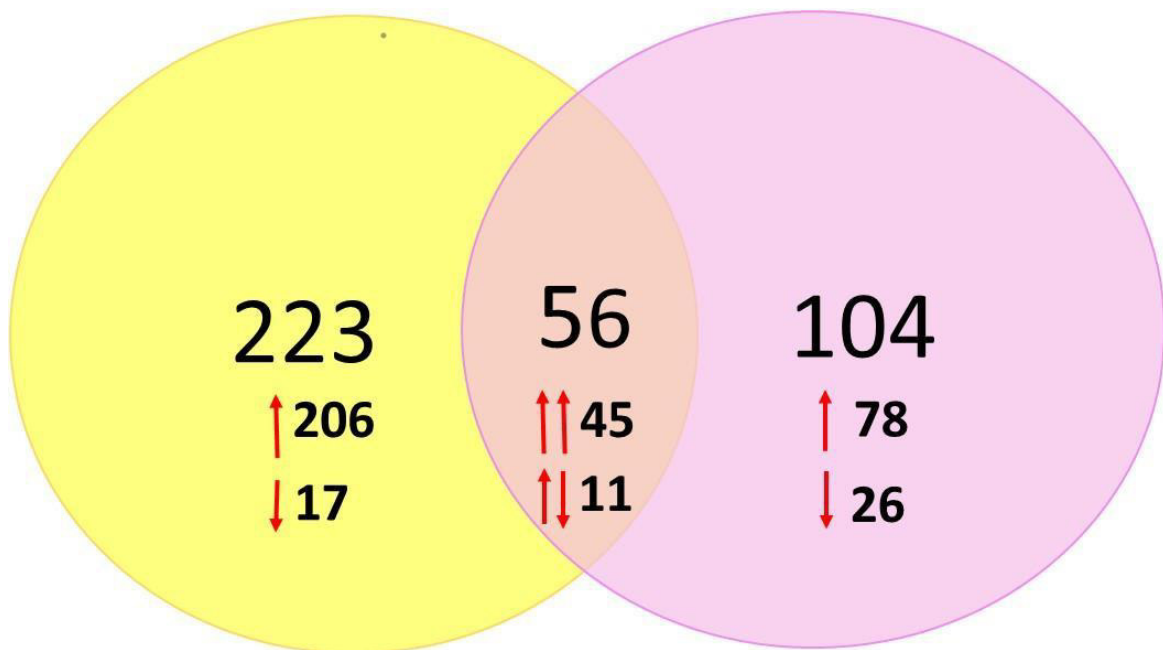


Figura 8. Número de genes expresados diferencialmente (DEGs) con el número de DEGs de la variedad tolerante (círculo amarillo) y la variedad susceptible (círculo rosado). Flecha arriba: genes sobreexpresados. Flecha abajo: genes reprimidos

a) **DEGs comunes**

Dentro del grupo de DEGs comunes sobreexpresados para ambas variedades (Tabla 6), se identificaron genes relacionados a la estructura y organización de la pared celular como la extensina (PGSC0003DMG400018315 y PGSC0003DMG400029700), expansina (PGSC0003DMG400030415), carbohidratos como el proteoglicano (PGSC0003DMG400009783) y arabinogalactano (PGSC0003DMG400003371, PGSC0003DMG400026274, PGSC0003DMG400029811 y PGSC0003DMG400012749), genes relacionados a la biogénesis de pared celular como la poligalacturonasa (PGSC0003DMG400030995), prolina (PGSC0003DMG400025757), proteína rica en glicina (PGSC0003DMG400031527), celulosa sintasa (PGSC0003DMG400031800) y pectinesterasa (PGSC0003DMG400028622).

Un segundo grupo de DEGs comunes sobreexpresados están implicados en el metabolismo de lípidos de la membrana celular, por ejemplo, las proteínas de

adhesión celular (PGSC0003DMG400006160), proteínas de unión a lípidos (PGSC0003DMG400022281 y PGSC0003DMG400021761) y desaturasa (PGSC0003DMG400028622)

Otro grupo de DEGs sobreexpresados están involucrados en el metabolismo de carbohidratos (degradación de sacarosa y síntesis de azúcares) como la sacarosa sintasa (PGSC0003DMG400013547), beta-glucosidasa (PGSC0003DMG400009036 y PGSC0003DMG400000689), galactosiltransferasa (PGSC0003DMG400021437) y glucosiltransferasa (PGSC0003DMG400008137).

Además, se identificaron proteínas anticongelantes como la taumatina (PGSC0003DMG400021142), la osmotina (PGSC0003DMG400000402) y genes con actividad oxidorreductasa (PGSC0003DMG400025274, PGSC0003DMG400004789 y PGSC0003DMG400021142).

Por último, dentro de este grupo se han identificado genes que codifican proteínas involucradas en la defensa de la planta como las quinasas de serina y treonina (PGSC0003DMG400001760 y PGSC0003DMG400006880) y en la síntesis de flavonoides (PGSC0003DMG400003640).

Tabla 6. DEGs comunes sobreexpresados en la variedad tolerante y susceptible de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* después del estrés por helada.

#	Gen	Locus	Cambio expresión en variedad tolerante	Cambio expresión en variedad susceptible
1	Sieve element occlusion	PGSC0003DMG400015156	6.77	2.03
2	Extensin	PGSC0003DMG400018315	6.49	7.58
3	Pistil-specific extensin	PGSC0003DMG400029700	5.45	3.50
4	Proteoglycan	PGSC0003DMG400009783	5.23	2.58
5	Sucrose synthase	PGSC0003DMG400013547	5.05	3.03
6	Arabinogalactan protein 2	PGSC0003DMG400003371	5.00	2.55
7	Thaumathin like protein	PGSC0003DMG400005748	4.56	3.73
8	Beta-glucosidase	PGSC0003DMG400009036	4.29	2.92
9	Cell adhesion protein	PGSC0003DMG400006160	4.25	2.62
10	Lipid binding protein	PGSC0003DMG400022281	3.90	3.40
11	Phytoeyanin-like	PGSC0003DMG400026274	3.78	4.02

	arabinogalactan-protein			
12	Osmotin	PGSC0003DMG40000402	3.56	2.30
13	P70 protein kinase	PGSC0003DMG400001760	3.40	3.54
14	Systemin receptor SR160	PGSC0003DMG400013198	3.35	2.20
15	Chalcone-flavanone isomerase family	PGSC0003DMG400003640	3.14	3.08
16	Serine threonine protein kinase	PGSC0003DMG400006880	3.13	2.31
17	Cytochrome P450	PGSC0003DMG400025274	3.12	2.31
18	Galactomannan galactosyltransferase	PGSC0003DMG400021437	3.10	2.52
19	Conserved of unknown function	PGSC0003DMG400016176	3.09	2.95
20	Polygalacturonase-1 non-catalytic subunit beta	PGSC0003DMG400030995	3.09	2.05
21	Protein trichome birefringence-like 36	PGSC0003DMG400023990	3.02	2.07
22	Wound/stress protein	PGSC0003DMG400013983	2.98	2.03
23	Probably nonspecific lipid-transfer protein AKCS9	PGSC0003DMG400021761	2.92	3.39
24	Acyl-protein thioesterase	PGSC0003DMG400028544	2.90	2.10
25	JHL25H03.13 protein	PGSC0003DMG400028622	2.72	2.12
26	Proline	PGSC0003DMG400025757	2.67	2.05
27	Cyclin B1	PGSC0003DMG401022702	2.67	3.34
28	Expansin18	PGSC0003DMG400030415	2.60	3.15
29	Gene of unknown function	PGSC0003DMG400033329	2.57	4.42
30	Fasciclin-like arabinogalactan protein 10	PGSC0003DMG400029811	2.53	2.25
31	Glycine-rich protein	PGSC0003DMG400031527	2.51	2.20
32	Gast1	PGSC0003DMG400003641	2.50	2.22
33	Pectinesterase	PGSC0003DMG400025967	2.49	2.57
34	Glucosyltransferase	PGSC0003DMG400008137	2.48	3.14
35	Multicopper oxidase	PGSC0003DMG400004789	2.48	3.10
36	Fasciclin-like arabinogalactan protein 13	PGSC0003DMG400012749	2.47	2.42
37	Cellulose synthase A catalytic subunit 3 [UDP-forming]	PGSC0003DMG400031800	2.42	3.15
38	Leucine-rich repeat receptor kinase	PGSC0003DMG400018849	2.31	3.10
39	DNA topoisomerase 2	PGSC0003DMG400006793	2.26	2.97
40	Disease resistance protein (TIR class)/ Cop1-interacting protein 7	PGSC0003DMG400012458	2.25	2.02
41	Profilin-1	PGSC0003DMG400026837	2.23	2.57
42	Histone H4	PGSC0003DMG400015525	2.11	2.37
43	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase	PGSC0003DMG400000689	2.09	2.15
44	Cutin-deficient 1 protein	PGSC0003DMG400000997	2.06	3.38
45	Sterol reductase	PGSC0003DMG400021142	2.06	3.35

En la Tabla 7 se presentan los 11 DEGs comunes sobreexpresados en la variedad tolerante y reprimidos en la variedad susceptible. Dentro de este grupo de genes, se identificaron genes con actividad oxidorreductasa (PGSC0003DMG400021966, PGSC0003DMG400022430, PGSC0003DMG402023841, PGSC0003DMG401007406 y PGSC0003DMG400020334) con actividad carboxilasa (PGSC0003DMG400026280 y PGSC0003DMG400026300), de respuesta a auxina (PGSC0003DMG400010207), relacionadas a la patogénesis (PGSC0003DMG400023435) y reguladores de transcripción (PGSC0003DMG400005641 y PGSC0003DMG400023405).

Tabla 7. DEGs comunes sobreexpresados en la variedad tolerante y reprimidos en la variedad susceptible de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* después del estrés a helada.

#	Gen	Locus	Cambio expresión en variedad tolerante	Cambio expresión en variedad susceptible
1	Laccase	PGSC0003DMG400021966	6.04	-3.62
2	Senescence-specific cysteine protease	PGSC0003DMG400010207	5.63	-4.57
3	Major allergen Pru ar	PGSC0003DMG400023435	4.14	-3.56
4	Polyphenoloxidase	PGSC0003DMG400022430	4.14	-2.25
5	Aromatic amino acid decarboxylase 2	PGSC0003DMG400026280	3.98	-2.59
6	Sterol desaturase	PGSC0003DMG402023841	3.73	-2.29
7	Fatty acyl-CoA reductase 1	PGSC0003DMG401007406	3.52	-2.69
8	Aromatic amino acid decarboxylase 2	PGSC0003DMG400026300	3.48	-4.92
9	Arogenate dehydrogenase 2	PGSC0003DMG400020334	3.18	-2.36
10	MYB	PGSC0003DMG400005641	3.17	-2.15
11	MYB transcription factor	PGSC0003DMG400023405	2.60	-3.01

b) DEGs exclusivos

Se identificaron 223 DEGs exclusivos para la variedad tolerante (Anexo 2) y 104 DEGs exclusivos para la variedad susceptible. Debido al gran número y a la importancia de los DEGs exclusivos en la variedad tolerante, la siguiente descripción se enfocará en los DEGs que presentaron un mayor cambio de

expresión con mayor significancia estadística, es decir, aquellos transcritos con *fold change* > 3 y menor *p-value* ($p < 0.05$), respectivamente.

Se identificaron como DEGs exclusivos a los relacionados al transporte antiporte de la membrana (PGSC0003DMG400002124), a los procesos de modificación post-traducciona como la ubiquitinación (PGSC0003DMG400032232), proteínas relacionadas a la defensa de la planta (PGSC0003DMG400001550, PGSC0003DMG400008485 y PGSC0003DMG400030134), biosíntesis de aminoácidos (PGSC0003DMG400029085), de respuesta a auxina (PGSC0003DMG400001274), proteínas con actividad ATPasa (PGSC0003DMG400016797), con actividad oxidoreductasa (PGSC0003DMG400007565, PGSC0003DMG400018064, PGSC0003DMG400023751, PGSC0003DMG400015185, PGSC0003DMG400024754, PGSC0003DMG400005062, PGSC0003DMG400030082, PGSC0003DMG400041652, PGSC0003DMG401011339 y PGSC0003DMG400030771), con actividad carboxilasa (PGSC0003DMG400029050), con actividad hidrolasa (PGSC0003DMG400029400, PGSC0003DMG400010221) y, con actividad liasa (PGSC0003DMG400018245 y PGSC0003DMG400034278)

También se identificaron DEGs relacionados a la organización de la pared celular (PGSC0003DMG400021682) y al metabolismo de carbohidratos de la pared celular (PGSC0003DMG400021630, PGSC0003DMG400030978, PGSC0003DMG400031046, PGSC0003DMG400004109, PGSC0003DMG400019483, PGSC0003DMG400030978, PGSC0003DMG400025063, PGSC0003DMG403024767 y PGSC0003DMG400024755).

Por último, se reportó un DEG asociado a una quinasa serina/treonina (PGSC0003DMG400008403) y reguladores de transcripción (PGSC0003DMG400001223 y PGSC0003DMG400026260).

c) Factores de transcripción (FTs)

Se empleó el programa iTAK para la búsqueda de los factores de transcripción (FTs) entre los DEGs en ambas variedades. En total, se identificaron 20 familias de FTs a partir de 51 DEGs (Figura 9). El número de familias de FTs en la variedad tolerante (n=16) fue mayor que el número de familias de FTs en la variedad susceptible (n=11).

Se identificaron 7 familias de FTs comunes: factores de transcripción con dominio APETALA 2/ proteína de unión a elementos de respuesta al etileno (APETALA2/*ethylene response factor*, AP2/ERF), de tipo básico hélice-lazo-hélice (*basic hélix loop*, bHLH), familia de proteínas de dedos de zinc de tipo Cys2/His2 (Cys2/His2-type *zinc finger protein* 2, C2H2), familia de proteínas con homeodominios (*homeobox*, HB), familia de proteínas de la mieloblastosis (*myeloblastosis*, MYB), familia de proteínas con dominio NAC, siendo la familia de quinasas ricas en secuencias repetidas de leucinas (*Leucine-rich repeat receptor-like kinases*, RLK-LRR) la que presentó el mayor número de DEGs.

En la variedad tolerante se identificaron 9 familias de transcripción exclusivas siendo las 2 familias más abundantes: la auxina indolacético (Auxin/INDOLE-3-ACETIC ACID, IAA) y la familia de proteínas relacionadas a mieloblastosis (*myeloblastosis related*, MYB-related), mientras que, en la variedad susceptible, se identificaron 4 familias de transcripción exclusivas.

Todos los DEGs pertenecientes a las familias de FTs mostraron sobreexpresión tras el estrés, a excepción de la familia Tify (familia exclusiva de la variedad susceptible), en la que el único DEG mostró represión. Esto sugeriría que, tras el estrés por frío, la activación transcripcional puede ser dominante sobre la represión.

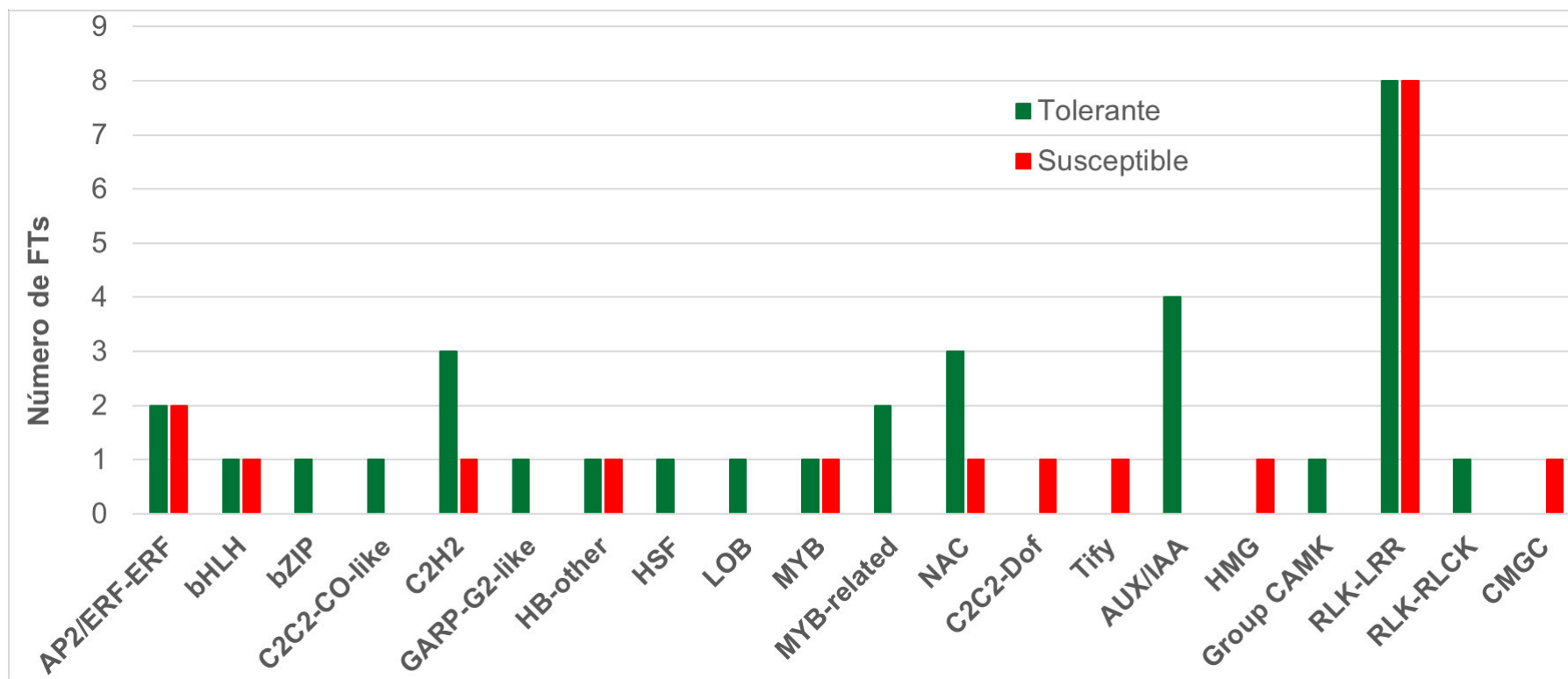


Figura 9. Distribución de factores de transcripción (FTs) diferencialmente expresados por familia de genes en respuesta al estrés por helada en dos variedades de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*.

6.5 Enriquecimiento funcional

Se empleó el programa Blast2GO v.4 para la anotación funcional de los DEGs utilizando BLASTX con un valor de corte esperado (*e-value*) 1×10^{-5} usando las bases de datos de proteínas no redundante (*non-redundant*, nr) del Centro Nacional de Informática Biotecnológica (*National Center for Biotechnology Information*, NCBI) y *Swiss-Prot* de Uniprot (Conesa *et al.*, 2005).

En el Anexo 3 se observó que, el mayor porcentaje de anotación (mayor del 70%) se produjo contra la especie en estudio: *Solanum tuberosum* y, en menor porcentaje a otras especies de la familia *Solanaceae*, tales como *Solanum lycopersicum*, *Solanum pennelli* entre otros.

Este programa distribuyó los DEGs en tres categorías funcionales principales: a) Procesos biológicos (BP, *Biological Process*), se refiere al papel celular o fisiológico realizado por el gen, b) Función molecular (MF, *Molecular Function*), se refiere a actividad molecular del gen y c) Componente celular (*Cellular Component*, CC), se refiere a la posición en la célula donde el gen ejecuta su función. Basado en esta categorización, se observó los principales procesos y funciones que son activados en las plantas tras el estrés por helada.

En la variedad tolerante, de los 279 DEGs identificados, 267 genes tuvieron *Blast hits* y de ellos, 225 DEGs se anotaron en las 3 categorías principales. En la categoría de procesos biológicos, los cuatro términos GO más frecuentes fueron procesos metabólicos (GO:0008152, 123 genes), procesos celulares (GO:0009987, 94 genes), respuesta a estímulos (GO:0050896, 28 genes) y localización (GO:0051179, 19 genes). En la categoría de funciones moleculares los términos más frecuentes fueron el de actividad catalítica (GO:0003824, 127 genes) y el de unión a moléculas (GO:0005488, 97 genes). Para la categoría de componente celular, los genes encontrados en mayor número se ubicaron en la membrana (GO:0016020, 92 genes) y en la célula (GO:0005623, 86 genes) (Figura 10).

En cuanto a la variedad susceptible, de los 160 DEGs identificados, 155 genes tuvieron *Blast hits* y de ellos 134 se anotaron en las 3 categorías principales. En la

categoría de procesos biológicos, los principales términos GO fueron el de procesos metabólicos (GO:0008152, 70 genes), procesos celulares (GO:0009987, 61 genes), respuesta a estímulos (GO:0050896, 13 genes) y biogénesis (GO:0071840, 12 genes). En la categoría de función molecular, la actividad catalítica (GO:0003824, 76 genes) y la de unión a moléculas (GO:0005488, 69 genes) fueron los términos GO más enriquecidos. En cuanto a los componentes celulares, el mayor número de genes fue encontrado en parte celular (GO:0044464, 63 genes) y en la membrana (GO:0016020, 55 genes) (Figura 11). Se debe mencionar que, en muchos casos, la misma secuencia pudo ser asignada a más de una categoría.

Distribución de términos GO por nivel 2 – Top 20

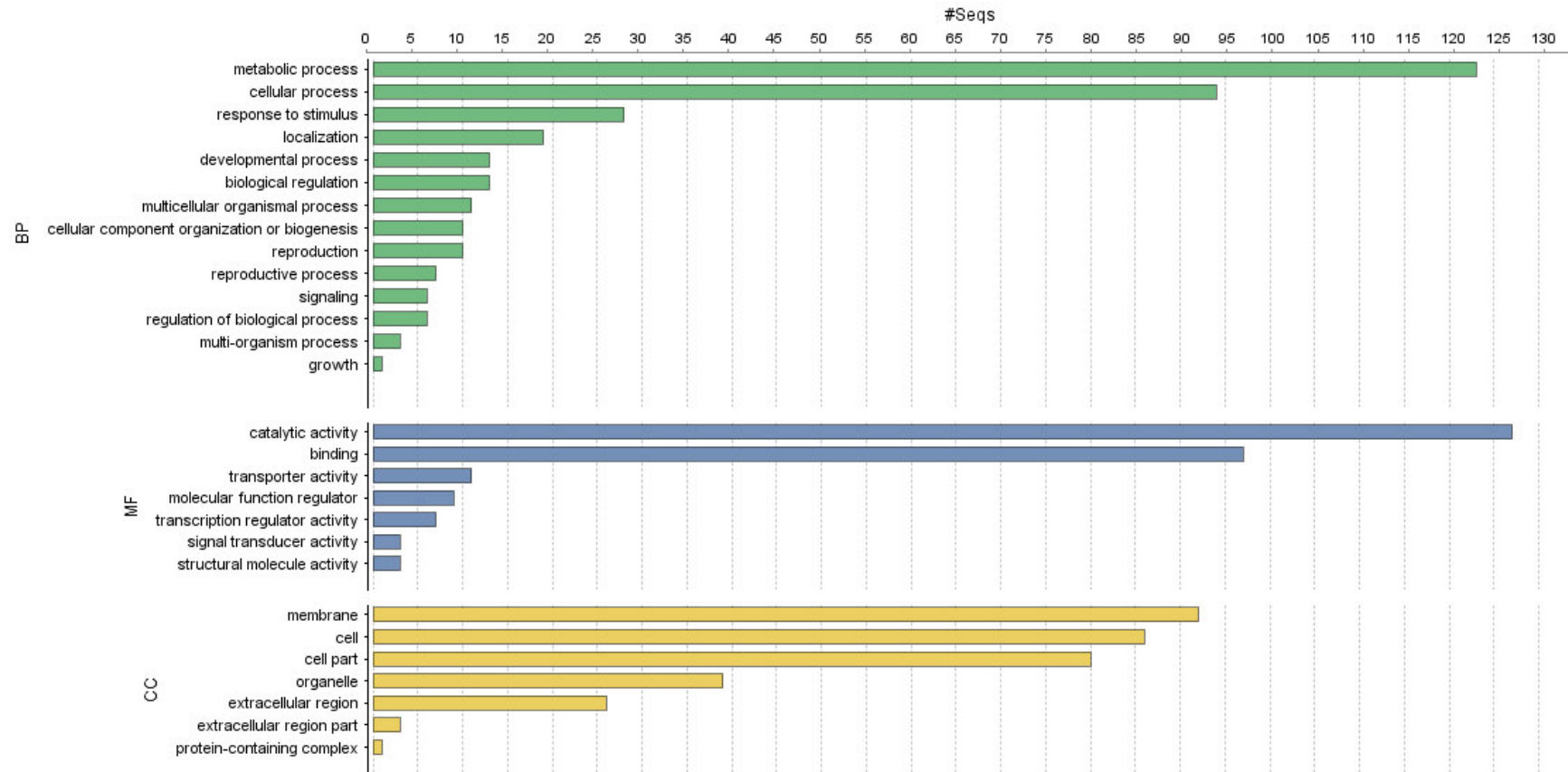


Figura 10. Distribución de los DEGs de la variedad tolerante de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* en cada categoría funcional: Proceso Biológico (BP), Función Molecular (MF) y Componente Celular (CC).

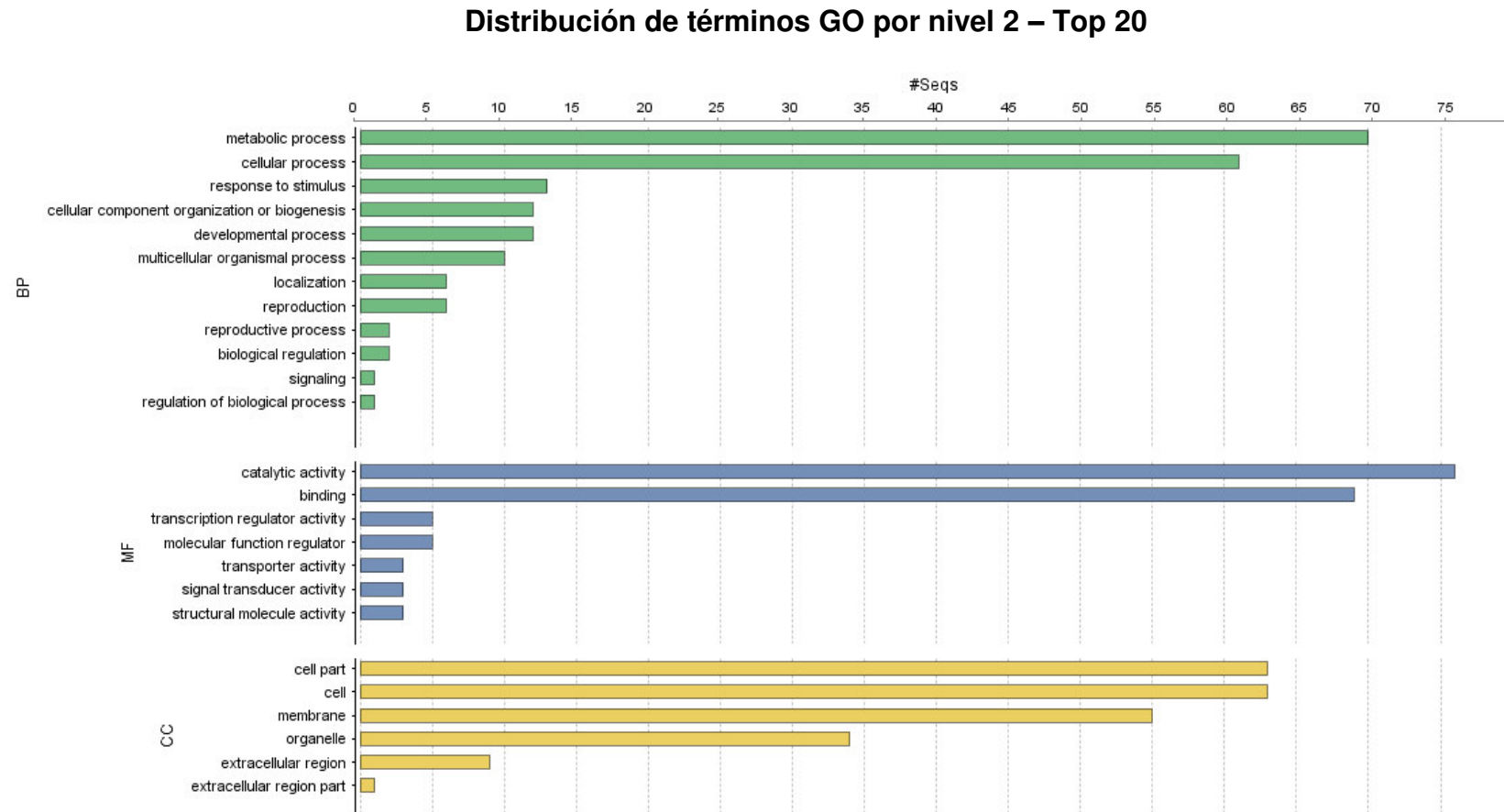


Figura 11. Distribución de los DEGs de la variedad susceptible de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* en cada categoría funcional: Proceso Biológico (BP), Función Molecular (MF) y Componente Celular (CC).

La comparación de las categorías funcionales entre la variedad tolerante y la variedad susceptible, reveló diferencias en la asignación de términos GO según los procesos biológicos, función molecular y componentes celulares (Figura 12).

a) Procesos biológicos

En total, se identificaron 14 sub-categorías dentro de procesos biológicos, siendo 12 de ellas, comunes para las variedades evaluadas, aunque representadas con la mayor cantidad de DEGs en la variedad tolerante y las otras dos sub-categorías fueron exclusivas para la variedad tolerante: procesos multiorganismo (GO:0051704) y el de crecimiento (GO:0040007). No se identificaron sub-categorías exclusivas para la variedad susceptible de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* (Figura 12).

En el caso de la variedad tolerante *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*, los procesos de localización (GO:0051179), regulación biológica (GO:0065007 y GO:0050789), señalización (GO:0023052), procesos multiorganismo (GO:0051704) y crecimiento (GO:0040007), se representaron por los DEGs exclusivos de la variedad tolerante, exhibiendo en su mayoría, genes en sobreexpresión a excepción del gen *Glucose-6-phosphate/phosphate translocator 2* (PGSC0003DMG400005269), que mostró represión tras el estrés.

b) Función molecular

En relación a la función molecular, en total se encontraron 7 sub-categorías, todas comunes, aunque representada en menor cantidad en la variedad susceptible, ninguna sub-categoría fue exclusiva para alguna de las dos variedades de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* evaluadas (Figura 12).

En esta categoría, la gran mayoría de DEGs tuvieron una función de actividad catalítica (GO:0003824) y de unión no específica (GO:000548). En este caso, las subcategorías: actividad de transporte (GO:0005215), función molecular reguladora (GO:0098772) y transducción de señales estuvieron representadas por los DEGs exclusivos de la variedad tolerante, los cuales también mostraron sobreexpresión en la mayoría de ellas, a excepción del gen *Glucose-6-*

phosphate/phosphate translocator 2 (PGSC0003DMG400005269), que mostró represión.

c) Componente celular

En esta categoría se identificaron 7 sub-categorías, de las cuales sólo el de complejo de proteínas (GO:0032991) fue exclusiva para la variedad tolerante de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*. Cabe mencionar que esta sub-categoría, estuvo representada únicamente por una proteína de dedos de zinc (PGSC0003DMG400011052) en represión.

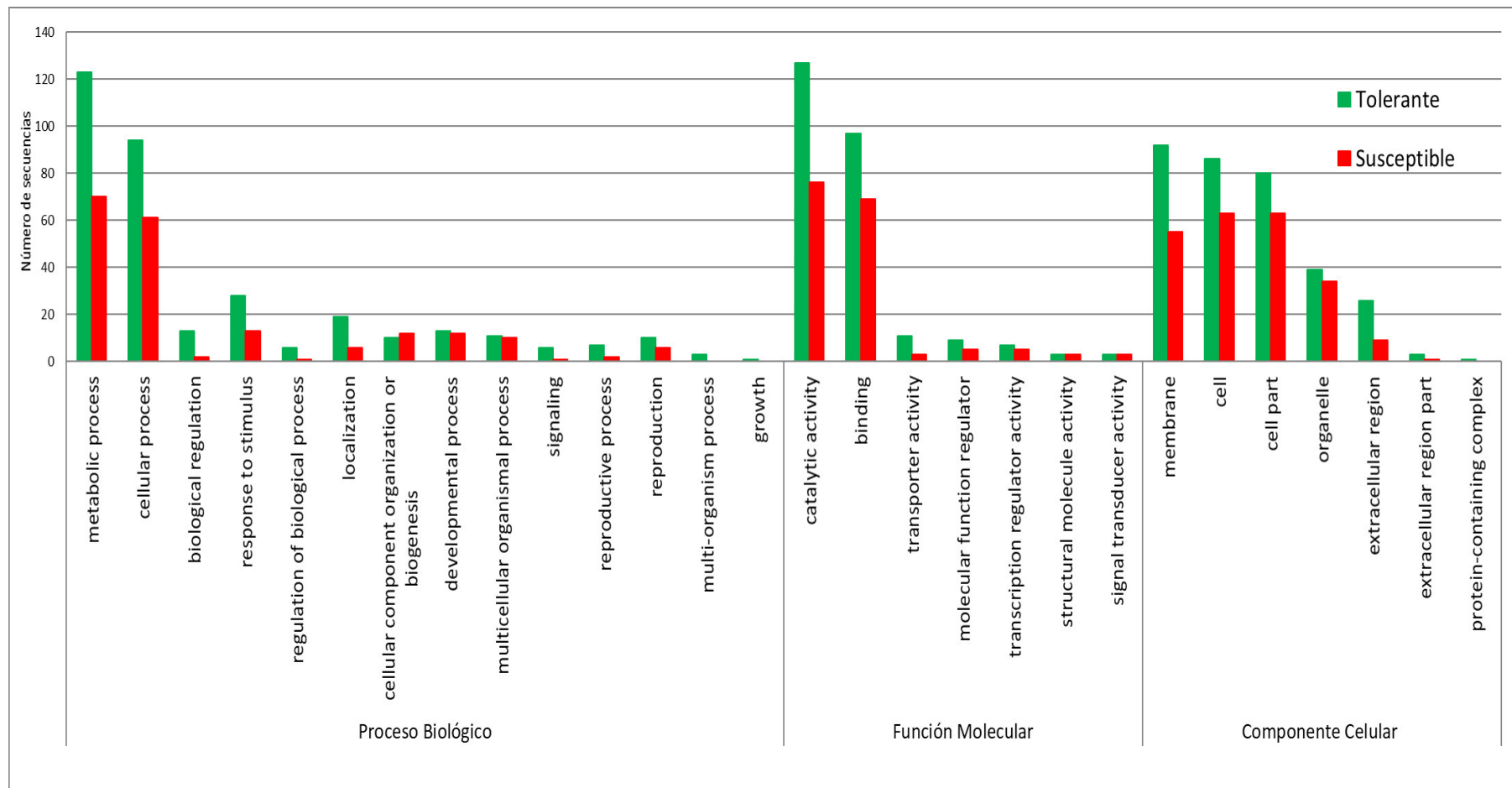


Figura 12. Categorización funcional asignada a los DEGs según la ontología de genes en la variedad tolerante y la variedad susceptible de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*.

VII. DISCUSIÓN

Las plantas son capaces de responder y adaptarse a diversos cambios ambientales. Este hecho se debe a la regulación de la expresión génica, a nivel transcripcional y post-transcripcional. El presente trabajo permitió la identificación de genes diferencialmente expresados en hojas de papa de una variedad tolerante y otra susceptible de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* al estrés por helada, vía RNA-seq.

Con la tecnología del RNA-seq, toda la población de RNA se secuenció a través de una biblioteca de cDNA, para lo cual se necesitó obtener RNA a una concentración y calidad adecuada. La extracción del RNA total a partir de hojas de papa nativa se realizó con Trizol, y el grado de pureza se determinó a través de las relaciones de absorbancia 260/280 obtenidas entre 1.8 y 2 (Sambrook *et al.*, 1989). Por lo tanto, la metodología de extracción de RNA usando Trizol probó ser una metodología efectiva para la extracción a partir de hojas de papa nativa, ya que se obtuvo RNA de buena calidad e integridad, condiciones requeridas para el secuenciamiento.

Se obtuvieron más de 242 millones de lecturas y un promedio de 20 millones de lecturas por biblioteca (Tabla 4). La homogeneidad del número de lecturas obtenidas resulta ser un factor importante durante la construcción de las bibliotecas (Head *et al.*, 2014). En este trabajo, la homogeneidad se reflejó en la baja diferencia del número de lecturas obtenidas entre bibliotecas del mismo tiempo y variedad.

Inicialmente, las tecnologías NGS produjeron lecturas de longitudes de 25 pb a 36 pb a partir del secuenciamiento de un sólo extremo (*single-end*) (Barski *et al.*, 2007). Actualmente, es posible producir lecturas de longitudes de hasta 300 pb, usando el secuenciamiento de los dos extremos (*paired-end*), llegando a considerarse que se podían obtener resultados más informativos a partir de lecturas de largas longitudes. Sin embargo, Chhangawala *et al.* (2015) reportaron

que el uso de lecturas con tamaños de 50 pb *single-end* vs 100 pb *paired-end* no afectó significativamente el proceso de identificación de la expresión diferencial. Por ello, al no reportarse diferencias significativas para el análisis de la expresión diferencial de genes, el secuenciamiento *single-end* resultó ser una alternativa económica para realizar nuestro trabajo, ya que el tipo de secuenciamiento *paired-end* tiene mayor costo (Barski *et al.*, 2007).

7.1 Control de calidad de secuencias

En cuanto al análisis de calidad por base, un valor de calidad es considerado aceptable, cuando es superior al valor de 20 en la escala de *Phred score* (Ewing & Green, 1998). Espinoza (2017) reportó un alto grado de pureza de las secuencias obtenidas tras el secuenciamiento, ya que estuvieron en un rango según *Phred score* de 22 a 30. Se observó que el *Phred score* para todas nuestras bibliotecas fue mayor a 30, es decir, la calidad de las secuencias de todas nuestras secuencias fue óptima.

Se evaluó el porcentaje de GC en las lecturas obtenidas, con el fin de verificar si se encuentran en distribución normal teórica. Para datos obtenidos de una biblioteca con distribución normal, se espera un contenido de GC entre 40% y 60% (Zhao *et al.*, 2017). El contenido promedio de GC de nuestros datos osciló entre 40% y 43%. Según bibliografía, el genoma de *S. tuberosum* posee aproximadamente 40% de su contenido en GC (Xiu-Qing & Donglei, 2014; Ibarra-Laclette *et al.*, 2011), coincidiendo con lo observado en este trabajo.

7.2 Alineamiento de secuencias contra el genoma de referencia

Se alinearon un total de 82.3% de lecturas (más de 199 millones de lecturas) de RNA-seq de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* al genoma de referencia (*Solanum tuberosum* Group Phureja) (Tabla 5). Trapnell *et al.* (2012), reportaron que porcentajes de alineamientos totales de lecturas inferiores al 70% indicarían presencia de lecturas de baja calidad y/o contaminantes. Por otro lado, un bajo porcentaje de lecturas únicas puede deberse al mismo proceso de amplificación por PCR o a problemas con la plataforma de secuenciamiento (Bailey *et al.*, 2013). Sin embargo, este no es el caso del presente trabajo, para el cual, se

obtuvo un promedio de 74% de lecturas únicas. En el caso de las lecturas múltiples, se observó un promedio de 8.4%. La presencia de alineamientos múltiples es normal, debido a la existencia de pseudogenes y duplicaciones genéticas válidas en el genoma (Pei *et al.*, 2012). Espinoza (2017) reportó porcentajes similares de lecturas alineadas al mismo genoma de referencia. Los resultados del presente trabajo mostraron que las lecturas obtenidas fueron consistentes y adecuadas para el análisis del transcriptoma.

7.3 Análisis de expresión diferencial de genes

En general, la variedad tolerante de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* moduló un mayor número de DEGs que la variedad susceptible (Figura 8). Sin embargo, Espinoza (2017) reportó un menor número de DEGs modulados tras el estrés en la variedad tolerante y, un mayor número de DEGs modulados tras el estrés en variedad susceptible. Cabe mencionar que, en su trabajo, la temperatura de la helada inducida fue de -4°C (temperatura menor a la utilizada en el presente trabajo), además las plántulas fueron previamente sometidas a un proceso de aclimatación a 4°C , posiblemente esta variación de temperaturas representó un estrés significativo para la variedad susceptible, por lo cual, se tuvo que activar un mayor número de mecanismos de respuesta al estrés para la sobrevivencia de esta variedad.

En cuanto al comportamiento de la modulación de genes, se identificó una mayor modulación positiva de DEGs en la variedad tolerante. Este resultado coincide con el reporte de Chaudhary & Sharma (2015), quienes identificaron una mayor sobreexpresión de DEGs en una variedad tolerante de pepino amarillo (*Hippophae rhamnoides*) tras el estrés por helada. Estos resultados revelarían que la respuesta al estrés por helada está correlacionada directamente con la regulación positiva de genes sobreexpresados.

7.3.1 DEGs comunes entre las variedades de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*

La respuesta de las plantas al frío, varía de una especie a otra. Sin embargo, independientemente de la complejidad de las especies vegetales, Bai *et al.* (2017)

reportó que el mecanismo común utilizado por las plantas para lidiar con el estrés por frío, implica cambios en la estructura de la pared celular y en la composición lipídica de la membrana, constituyendo la primera línea de defensa de la planta. Dentro de los DEGs comunes sobreexpresados para ambas variedades de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*, encontramos que la mayoría de los genes estuvieron involucrados en los cambios de la composición de la pared y membrana celular, enzimas involucradas en el metabolismo de carbohidratos (sacarosa sintasa, beta-glucosidasa, galactanos, poligalacturonasa y glucosiltransferasas), proteínas anticongelantes y factores de transcripción.

- Genes relacionados a la pared y membrana celular

La pared celular cumple el papel de barrera física y de defensa contra el estrés biótico y abiótico. Las extensinas son glicoproteínas ricas en hidroxiprolinas, esenciales para el ensamblaje y crecimiento de la pared celular. Por otro lado, las expansinas son proteínas que tienen acción en el aflojamiento de la pared celular, en la expansión celular y en todo proceso relacionado con la modificación de la pared celular, por lo tanto, la alteración en el crecimiento y desarrollo de las plantas a bajas temperaturas está relacionado a la inhibición de la expresión de genes expansinas (Zheng *et al.*, 2010). Gall *et al.* (2015) reportaron sobreexpresión de expansinas en diferentes especies, la cual resultó en diferentes grados de tolerancia al estrés. Peng *et al.*, (2015) reportaron un gran número de DEGs de extensinas y expansinas, a quienes se les atribuyó el incremento de la rigidez de la pared celular y, por ende, resistencia al colapso celular causada por la deshidratación inducida por el frío (4 °C).

Las proteínas arabinogalactanos son un tipo de proteoglicanos ricos en hidroxiprolina, altamente glicosiladas, muy resistentes a la proteólisis debido a su alto grado de glicosilación, localizadas primordialmente en las paredes celulares, membrana plasmática y en los espacios intracelulares (Lafarguette *et al.*, 2004). En algodón se ha reportado que la sobreexpresión de estas proteínas tiene la capacidad de aumentar la estabilidad de la pared celular tras el estrés (Gong *et al.*, 2011). Las proteínas fasciclin de tipo arabinogalactano están involucradas en el crecimiento de la planta, desarrollo y respuesta a estrés abiótico (Gaspar *et al.*

2001; Johnson *et al.*, 2003). El incremento en la tolerancia al frío en la variedad tolerante estaría relacionado con el incremento de la expresión de los arabiogalactanos que sirve como protector después de la exposición a la helada.

Chen & Li (1980) reportaron un incremento similar en las concentraciones de azúcares en hojas de dos especies silvestres de *Solanum*: *Solanum acaule* y *Solanum commersonii* (ambas tolerantes al frío) a diferencia de la especie cultivada *Solanum tuberosum* (susceptible al frío), tras la exposición al estrés por frío, siendo esta última la especie que murió tras el estrés. La acumulación de azúcares a través de la síntesis de sacarosa y degradación del almidón y celulosa, además de proteger la membrana plasmática a través del ajuste osmótico, también participa en la captura de las ROS (Chen & Li 1980, Bogdanovic *et al.*, 2008, Wang *et al.*, 2013).

La sacarosa protege directamente la membrana celular tras el estrés al interactuar con el fosfato de los grupos lipídicos de la membrana, disminuyendo de esta manera, la permeabilidad de la misma (Strauss & Hauser, 1986). Se reporta sobreexpresión de la sacarosa sintasa en ambas variedades de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*, enzima clave para la producción de sacarosa.

- Factores de transcripción

La percepción del estrés es el primer paso para la activación de las respuestas adaptativas con el objetivo de lograr la supervivencia de las plantas. Los RLK-LRRs son los principales factores de transcripción reguladores en la percepción y el procesamiento de estímulos extracelulares que conducen a la expresión de genes que permiten la adaptación a situaciones de estrés (Dievart *et al.*, 2016). Generalmente, perciben señales extracelulares a través del dominio LRR y transmiten las señales mediante sus dominios serina/treonina quinasa (RK). Se ha reportado actividad de las RLK-LRRs en los eventos de señalización hormonal como respuesta a estímulos ambientales (Morris & Walker, 2003). Yang *et al.* (2014) reportaron que la sobreexpresión de un LRR-RLK de *Glycine soja* (GsLRPK) mejoró la resistencia al estrés por frío en levadura y *Arabidopsis*. Wang *et al.*, (2018) identificaron un mayor número de RLKs sobreexpresados en *Dendranthema grandiflorum* tras estrés por helada (-4 °C) vs estrés por frío (4 °C).

Por otro lado, la familia AP2/ERF se caracteriza por la presencia del dominio AP2/ERF de 60 a 70 aminoácidos y por ser específico de plantas (Rashid *et al.*, 2012). Las funciones de estos FTs han sido ampliamente estudiadas e identificadas en la regulación de la respuesta a diferentes tipos de estrés abiótico (Xie *et al.*, 2016). Xu *et al.* (2017) reportaron 23 genes pertenecientes a la familia AP2-ERF regulados por el estrés por helada, indicando que esta familia juega un rol importante en la respuesta al congelamiento en *Eriobotrya japonica* (níspero japonés).

En este trabajo, RLK-LRR y AP2/ERF fueron las familias con mayor cantidad de FTs identificadas (Figura 9), las cuales han sido reportadas en los procesos de respuesta al estrés por bajas temperaturas en numerosas especies (Liu *et al.*, 1998; Nakashima *et al.*, 2012; Kovi *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2014; Changsong & Diqui, 2010). Estos resultados corroborarían que la sobreexpresión de estas familias de FTs estarían asociadas en la regulación de la respuesta al estrés a bajas temperaturas en papa.

Otro grupo de FTs fue la familia NAC, nombre que deriva de las 3 primeras proteínas descritas que contienen el dominio de unión al DNA, llamados *NAM* (*no apical meristem*), *ATAF1-2* (*Arabidopsis thaliana activation factor*) y *CUC* (*cup-shaped cotyledon*) (Christianson *et al.*, 2010) también están involucrados en la respuesta al estrés biótico y abiótico (Nuruzzaman *et al.*, 2013; Nakashima *et al.*, 2012; Puranik *et al.*, 2012). Esos FTs pueden ser efectores de señalización por frío y actuar en la reprogramación del desarrollo de las plantas para lidiar con el estrés por frío (Trans *et al.*, 2004). Nakashima *et al.* (2007) reportaron que la sobreexpresión del gen *OsNAC6* en líneas de arroz transgénico, aumentó la tolerancia al frío. Xu *et al.* (2017) reportaron que la segunda familia más abundante de FTs fue la familia NAC, la cual presentó 9 de sus 11 genes sobreexpresados en respuesta al estrés por helada. Huang *et al.* (2013) identificaron la inducción de los genes *GhNAC8* y *GhNAC11* por temperaturas frías, sugiriendo la intervención de las mismas en la regulación del desarrollo bajo estrés abiótico. Qu *et al.* (2016) reportaron que la sobreexpresión de *MfNAC3* por

baja temperatura, permitió incrementar significativamente la tasa de sobrevivencia tras el estrés por frío, indicando que la familia NAC juega un importante rol positivo en la tolerancia a las bajas temperaturas.

- Proteínas anticongelantes

Dentro del grupo de DEGs comunes, también se identificaron algunas proteínas anticongelantes (*anti-freezing proteins*, AFP), proteínas similares a la taumatina (*thaumatin-like proteins*, TLPs), osmotina (*osmotin*), que son secretadas en el apoplasto de las hojas y tienen la habilidad de inhibir la recristalización del hielo en el espacio intracelular y prevenir la formación del hielo intracelular (Griffith & Yaish, 2004; Janska *et al.*, 2010). Wang *et al.* (2018) reportaron en *Dendranthema grandiflorum*, la sobreexpresión de proteínas anticongelantes como la thaumatine y la polygalacturonase. Sarad *et al.* (2004) desarrollaron un tomate transgénico con gen de osmotina introducido por transformación con *Agrobacterium*. Sus pruebas preliminares revelaron que las plantas transgénicas fueron más tolerantes al frío que las silvestres.

7.3.2 DEGs comunes entre las variedades de *Solanum tuberosum* subsp. andigena

Otro grupo de DEGs comunes identificados fueron los que mostraron comportamiento antagónico entre las variedades de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* (sobreexpresión en variedad tolerante y represión en la variedad susceptible). Dentro de este grupo se identificaron genes relacionados a pared y membrana celular, además de enzimas hidrolíticas y con actividad oxidorreductasa y factores de transcripción del tipo MYB.

- Genes relacionados a la pared y membrana celular

Las plantas con fallas o disminución en la actividad desempeñada por las desaturasas, mostraron inhibición del crecimiento o muerte (Miquel *et al.*, 1993; Falcone *et al.*, 2004). Una reducción en la fluidez de la membrana plasmática de *Synechocystis* inducida por baja temperatura parece ser la señal primaria para la expresión de los genes desaturasas (Murata & Los, 1997). Maali-Amiri *et al.* (2007) transformaron plantas de papa con el gen desaturasa (desA) y tras la exposición a -7 °C, las plantas transformadas mostraron bajas tasas de

peroxidación y mayor concentración de ácidos grasos insaturados, con características asociadas a la tolerancia como viabilidad, menos daño visible y alta producción de microtubérculos, concluyendo que, el gen desaturasa puede conferir tolerancia al estrés por congelamiento. En este trabajo, se debe resaltar que la mayoría de los genes relacionados al metabolismo de lípidos fueron sobreexpresados en la variedad tolerante de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*, a diferencia de la variedad susceptible que mostró inhibición del gen en mención.

- Proteínas anticongelantes

En plantas, la lignina es el principal componente de las paredes secundarias (Schreiber *et al.*, 1999) y su síntesis es regulada principalmente por la lacasa (Liang *et al.*, 2006), la cual estaría involucrada en el mantenimiento de la estructura y la integridad de la pared celular, así como en las respuestas de las plantas al estrés ambiental (Wang *et al.*, 2015), sin embargo, aún no ha sido reportada tras un estrés por helada. En el presente trabajo fue reportado como uno de los genes con expresión antagónica entre las variedades de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*.

- Factores de transcripción

Los factores de transcripción tipo MYB codifican proteínas con dominios de unión a DNA, identificados por primera vez en la proteína codificada por el oncogen v-MYB aislado del virus aviar de la mieloblastosis (*avian myeloblastosis virus*) (Klempnauer *et al.*, 1982). Estas proteínas son factores claves para la regulación de la transcripción de genes que controlan el desarrollo, metabolismo y respuesta a diferentes condiciones de estrés (Yanhui *et al.*, 2006). Su *et al.* (2010) evaluaron y sugirieron que la expresión de *MYBS3* fue suficiente y necesaria para la tolerancia al estrés por frío en líneas transgénicas de *Oryza sativa*.

- Otros

La mayoría de las proteínas implicadas en la defensa de las plantas forman parte de las denominadas proteínas relacionadas con la patogénesis (*pathogenesis related*, PR) como las TSI-1 y *Major allergen Pru ar*, que son inducidas en asociación con las respuestas de resistencia (van Loon *et al.*,

2006). Se ha reportado la acumulación de PRs inducidas por el frío (Hon *et al.*, 1995) que pueden modular la formación de hielo y actuar como anticongelantes (Griffith *et al.*, 2005; Griffith & Yaish, 2004).

7.3.3 DEGs exclusivos de la variedad tolerante de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*

Uno de los DEGs que mostró mayor sobreexpresión en la variedad tolerante de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* fue el codificador para una proteína transportadora (*antiporter*) que interviene en el eflujo del Ca^{2+} citoplasmático. El ingreso y aumento de calcio en el citoplasma, es importante para la activación de respuestas bioquímicas y transducción de señales, que permiten la adaptación al estrés (Liang *et al.*, 2009). La deficiencia del Ca^{2+} depende más del transporte inadecuado que de la baja absorción o biodisponibilidad de ese elemento. Se ha reportado aumento de los niveles de Ca^{2+} tras estrés por frío y sequía (Bowler & Fluhr, 2000; Knight & Knight, 2001).

El segundo DEG sobreexpresado exclusivamente en la variedad tolerante de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* fue la ubiquitin U-box ligasa. El estrés de temperatura provoca alteraciones en la conformación de las proteínas, impidiendo el correcto funcionamiento de las mismas, siendo necesaria su degradación. El gen de ubiquitin ligasa está encargada de la ubiquitinación de estas proteínas para su posterior degradación (Song *et al.*, 2017). En *Arabidopsis*, se ha demostrado que las plantas transgénicas que sobreexpresaron los genes *PUB22* y *PUB23* (genes codificadores de ligasas de ubiquitina) incrementaron su sensibilidad tras el estrés por sequía, indicando que *PUB22* y *PUB23* funcionaron como reguladores negativos en respuesta al estrés hídrico (Cho *et al.*, 2008). Por otro lado, Min *et al.* (2016) reportaron que la expresión constitutiva del gen *U-box* ligase de *Capsicum annuum* (*Ubi:CaPUB1*) en *Oryza sativa* incrementó la tolerancia al estrés por frío.

Otro de los grupos de DEGs expresados exclusivamente en la variedad tolerante de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* fueron:

- Genes relacionados a la pared y membrana celular

Uno de los grupos de DEGs exclusivos relacionados a la pared celular fueron los xiloglucano b-transglucosilasas/hidrolasas, los cuales juegan un rol importante en la modulación de la biogénesis de la pared celular y la sobreexpresión de este gen ha sido asociada a la adaptación de *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa* a bajas temperaturas (Bray, 2004; Dong *et al.*, 2011).

Otro grupo de DEGs exclusivos estuvo conformado por las proteínas de transferencia de lípidos (*lipid transfer proteins*, LTP) contribuyen en la transferencia de fosfolípidos entre las membranas y también pueden unir las cadenas acilo, están involucradas en la biogénesis de la membrana y regulación de los ácidos grasos (Kader, 1996). Se ha sugerido que los LTP están implicados en la formación de la cutina y en la adaptación de las plantas a diversas condiciones ambientales, incluido el estrés por frío (Moraes de Freitas *et al.*, 2016). Se ha demostrado en *Arabidopsis* que la sobreexpresión de LTP3 aumentó la tolerancia a la congelación (Guo *et al.*, 2013).

La beta-glucosidasa es una enzima asociada a la membrana y permite la conversión de la celobiosa a glucosa durante la hidrólisis de la celulosa (Knight & Knight, 2012). A pesar de ser una enzima poco estudiada en estrés abiótico, Thorlby *et al.*, (2004) señalaron que líneas transgénicas de *Arabidopsis*, sensibles a bajas temperaturas, presentaron tolerancia a helada cuando la enzima beta-glucosidasa fue inducida.

- Enzimas hidrolíticas

Las poligalacturonasas son enzimas hidrolíticas involucradas en numerosos programas de desarrollo que involucran modificaciones de la pared celular (Cosgrove, 2000). Las pectinesterasas catalizan la desacetilación de la pectina, compuesto principal de las paredes celulares y contribuyen en la reología de las pectinas junto con las poligalacturonasas (Zabackis *et al.*, 1995). La celulosa sintasa está relacionada con el crecimiento y la reestructuración de la pared celular (Cosgrove, 2005). El estrés por frío tiene un drástico efecto en la regulación de los genes que codifican la celulosa sintasa. Zhong *et al.* (2012), reportó sobreexpresión de estos genes en un genotipo de arroz tolerante al frío, después de 48 horas de exposición al frío. Sin embargo, Zhu *et al.* (2013)

reportaron regulación negativa de estos genes en un genotipo de algodón, tras el tratamiento de frío.

- Enzimas antioxidantes

El estrés inducido por frío provoca la producción y acumulación de ROS como los radicales superóxidos, iones de oxígeno, peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilos entre otros, provocando daño oxidativo en biomoléculas como las proteínas, DNA y lípidos (Jaleel *et al.*, 2007; Suzuki *et al.*, 2012). Un estudio previo reveló que muchas enzimas (peroxidasa, catalasa, glutatión S-transferasa, glutatión peroxidasa, polifenol oxidasa, glutaredoxina, entre otros) involucradas en el secuestro de ROS, se indujeron bajo el estrés por frío (Cheng *et al.*, 2007).

La transducción de señal empieza con la percepción de la señal y producción de mensajeros secundarios como el calcio, especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS) y otros, los cuales modulan los niveles de calcio intracelular (Ca^{2+}). Esta alteración es detectada por proteínas que son capaces de unirse al Ca^{2+} como la calmodulina, activando una cascada de fosforilaciones/defosforilaciones dirigidas a proteínas implicadas en la protección celular o a los factores de transcripción que controlan los genes de respuesta a estrés (Xiong *et al.*, 2002).

Guo *et al.* (2006) reportaron que el estrés por frío, aumentó la actividad enzimática de la catalasa, el ascorbato peroxidasa y el superóxido dismutasa en un cultivar de arroz tolerante, mientras que disminuyeron en el cultivar susceptible. Fu *et al.* (2016) compararon el perfil de expresión génica por RNA-seq de dos genotipos de *Elymus nutans* Griseb (especie forrajera de China) con respuesta contrastante al estrés por frío. Los autores reportaron elevada acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) tras el estrés por frío y menor actividad de enzimas antioxidantes en la variedad susceptible comparada con la variedad tolerante, lo cual podría contribuir a un menor daño oxidativo en la variedad tolerante. En este trabajo se encontraron 3 DEGs comunes, codificadores de enzimas con actividad oxidorreductasa, sin embargo, la mayor cantidad de DEGs asociados a este tipo de enzimas se reportaron como reprimidas en la variedad susceptible o como exclusivas de la variedad tolerante,

por lo tanto, considerándoles un grupo de genes importantes en la tolerancia al estrés por helada.

- Proteínas de choque térmico

Además, encontramos un grupo de proteínas relacionadas al frío: proteínas reguladas por el frío (*cold-regulated*, COR) y proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*, HSP), que están involucradas en el proceso de respuesta a la baja temperatura. Los factores o proteínas de choque térmico (*Heat shock factor*, HSF o *Heat shock protein*, HSP) aumentan su expresión cuando las células están expuestas a variaciones de temperatura o a otras tensiones ambientales y funcionan como chaperonas intracelulares (Heidarvand & Amiri, 2010). HSF y HSP20 fueron sobreexpresados específicamente en la variedad tolerante de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*, en contraste con la variedad susceptible, resultados que coinciden con los reportados por Lucau-Danila *et al.*, 2010. Esta expresión en la variedad tolerante, contribuiría en la estabilización de la conformación proteica, fortaleciendo su capacidad de tolerancia al frío.

- Factores de transcripción

La familia de proteínas de auxinas *ácido indolacético* (Aux/IAA) son conocidas por regular la expresión génica en la transducción de señales de auxina (Luo *et al.*, 2018). Sin embargo, existen pocos reportes sobre la acción de estas familias tras estrés abiótico (Shani *et al.*, 2017). En este trabajo la familia Aux/IAA fue la familia con mayor número de factores de transcripción expresados exclusivamente en la variedad tolerante de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* (3 DEGs, Figura 9).

VIII. CONCLUSIONES

1. La técnica de RNA-seq permitió evaluar los perfiles de expresión génica en hojas de papa de dos variedades de papas nativas de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* tras la exposición al estrés por helada.
2. La variedad tolerante “Yana Manwa” activó un mayor número de genes frente a la variedad susceptible “Yuraq Gaspar” de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* en respuesta al estrés por helada.
3. Ambas variedades de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* sobreexpresaron genes similares implicados en la organización estructural de la pared y membrana celular, metabolismo de carbohidratos y metabolismo de lípidos, en respuesta al estrés por helada.
4. Los genes con actividad antioxidante, proteínas de choque térmico, y factores de transcripción (familia Aux/IAA) constituyen los genes candidatos de tolerancia al estrés por helada en *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*.

IX. RECOMENDACIONES

- Realizar la validación de la expresión génica de los genes candidatos de tolerancia de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* al estrés por helada mediante un análisis de PCR Real Time.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ambardar, S., Gupta, R., Trakroo, D., Lal, R., Vakhlu, J. (2016) High throughput Sequencing: An overview of sequencing chemistry. *Indian Journal of Microbiology*, **56**(4): 394-404.
- Bahmani, M. and Maali-Amari. (2015) Genetic regulation of cross tolerance in plants under biotic and abiotic stresses. *Genetics in the Third Millennium*, **13**(3): 4076-4083.
- Bai, Z.Y., Wang, T., Wu, Y. H., Wang, K., Liang, Q. Y., Pan, Y. Z. (2017) Whole-transcriptome sequence analysis of differentially expressed genes in *Phormium tenax* under drought stress. *Scientific Reports*, **7**, 41700 <http://doi.org/10.1038/srep41700>.
- Bailey, T., Krajewski, P., Ladunga, I., Lefebvre, C., Li, Q., Liu, T., *et al.* (2013) Practical guidelines for the comprehensive analysis of ChIP-seq Data. *Plos Computational Biology*, **9**(11): e1003326. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003326
- Barrientos, M., Mol, E., Peruzzo, G., Contreras, A., and Alberdi, M. (1994). Responses to cold of Chilean wild *Solanum* species. *Environmental and Experimental Botany*, **34**(1): 47-54.
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.Y., Schones, D.E., Wang, Z., *et al.* (2007) High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*, **129**: 823-837.
- Becana, M., Moran, J.F., Iturbe-Ormaeste, I. (1998) Iron-dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress, toxicity and antioxidant protection. *Plant and Soil*, **201**: 137-147.
- Bedogni, M., Capezio, S., Huarte, M. (2009) Comportamiento frente a estrés hídrico de variedades nativas y especies silvestres de papa. *Revista Latinoamericana de Papa*, **15**(1): 72-74.
- Bogdanovic, J., Mojovic, M., Milosavic, N., Mitrovic, A., Vucinic, Z. (2008) Role of fructose in the adaptation of plants to cold induced oxidative stress. *European Biophysical Journal*, **37**: 1241-1246.
- Bowler, C. and Fluhr, R. (2000) The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. *Trends in Plant Science*, **5**: 241-246.

- Bray, E.A. (2004) Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, **55**: 23–31.
- Centro Internacional De La Papa (Cip) y Federacion Departamental De Comunidades Campesinas De Huancavelica (Fedecch) (2006) Catalogo de Variedades de papa Nativa de Huancavelica. Huancavelica, Perú: Editorial Metrocolor.
- Changsong, Z., and Diqui, Y. U. (2010) Analysis of the Cold-responsive transcriptome in the mature pollen of *Arabidopsis*. *Journal of Plant Biology*, **53**, 400–416. doi: 10.1007/s12374-010-9129-4.
- Chaudhary S, Sharma PC (2015) DeepSAGE Based Differential Gene Expression Analysis under Cold and Freeze Stress in Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). *PLoS ONE*, **10**(3): e0121982. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121982>.
- Chen, H., Chen, X., Chai, X., Qiu, Y., Gong, C., Zhang, Z., *et al.* (2015) Effects of low temperature on mRNA and small RNA transcriptomes in *Solanum lycopersicoides* leaf revealed by RNA-Seq. *Biochemical and biophysical research communications*, **464**: 768–773. 10.1016/j.bbrc.2015.07.029.
- Chen, J., Tian, Q., Pang, T., Jiang, L., Wu, R., Xia, X., *et al.* (2014) Deep sequencing transcriptome analysis of low temperature perception in a desert tree, *Populus euphratica*. *BMC Genomics*, **1**: 326. doi:10.1186/1471216415326.
- Chen, J., Agrawal, V., Rattray, M., West, MA., St Clair DA., Michelmore, RW *et al.* (2007) A comparison of microarray and MPSS technology platforms for expression analysis of *Arabidopsis*. *BMC Genomics*, **8**: 414.
- Chen H.H. and Li P.H. (1980) Characteristics of cold acclimation and deacclimation in tuber-bearing *Solanum* species. *Plant Physiology*, **65**: 1146-1148.
- Cheng C., Yun K.Y., Ressom H.W., Mohanty B., Bajic V.B., Jia Y., Yun S.J., Reyes B.G. (2007) An early response regulatory cluster induced by low temperature and hydrogen peroxide in seedlings of chilling-tolerant japonica rice. *BMC Genomics*, **8**: 175–192.
- Chhangawala, S., Rudy, G., Mason, C.E., and Rosenfeld, J.A. (2015) The impact of read length on quantification of differentially expressed genes and

splice junction detection. *Genome Biology*, **16**: 131. <http://dx.doi.org/10.1186/s13059-015-0697-y>.

- Cho, SK., Ryu, MY., Song, C., Kwak, JM and Kim, WT. (2008) *Arabidopsis* PUB22 and PUB23 are homologous U-box E3 ubiquitin ligases that play combinatory roles in response to drought stress. *Plant Cell*, **20**: 1899-1914.
- Condori, B., Hijmans, R.J., Ledent, J.F. and Quiroz, R. (2014) Managing potato biodiversity to cope with frost risk in the high Andes: A modeling perspective. *PLoS ONE*, **9**(1): 1–11.
- Conesa, A. and Götz, S. (2008) Blast2go: a comprehensive suite for functional analysis in plant genomics, *International Journal of Plant Genomics*, **2008**: 1-13.
- Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, JM, Terol, J., Talón, M. and Robles, M. (2005) Blast2go: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, **21**: 3674-3676.
- Cosgrove, D.J. (2005) Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **6**(11): 850-861.
- Cosgrove, D.J. (2000) Expansive growth of plant cell walls. *Plant Physiology and Biochemistry*, **38**: 109-124.
- Christianson, J.A., Dennis, E.S., Llewellyn, D.J., Wilson, I.W (2010) ATAF NAC transcription factors: regulators of plant stress signaling. *Plant Signal. Behav*, **5**: 428-432.
- DeLong, J.M. and Steffen, K. (1998) Lipid peroxidation and α -tocopherol content in α -tocopherol-supplemented thylakoid membranes during UV-B exposure. *Environmental and Experimental Botany*, **39**: 177-185.
- Devaux, A., Ordinola, M., Hibon, A. and Flores, R. (2010) El sector papa en la región andina. Diagnóstico y elementos para una visión estratégica (Bolivia, Ecuador y Perú). CIP (Centro Internacional de la Papa).
- Dievart, A., Perin, C., Hirsch, J., Bettembourg, M., Lanau, N., *et al.* (2016) The phenome analysis of mutant alleles in Leucine-Rich Repeat Receptor-Like Kinase genes in rice reveals new potential targets for stress tolerant cereals. *Plant Science*, **242**: 240-249. doi: 10.1016/j.plantsci.2015.06.019.
- Dong, J., Jiang, Y., Chen, R., Xu, Z. and Gao X. (2011) Isolation of a novel xyloglucan endotransglucosylase (OsXET9) gene from rice and analysis of the

response of this gene to abiotic stresses. *African Journal of Biotechnology*, **10** (76): 17424–17434 10.5897/ajb11.1242.

- Espinoza Kou Mey-Ling. Análisis transcriptómico de la respuesta a heladas en papas nativas. Tesis para optar grado de Magíster en Bioquímica y Biología Molecular. 2017. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Perú.
- Ewing, B. and Green, P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research*, **8**: 186–194.
- Fairlie, T. E. and Ortega, A. (1995) Efecto de la presencia de heladas simuladas en diferentes estados fenológicos y su impacto en el rendimiento de la papa cv Ccompis: estudio preliminar. *Revista Latinoamericana de la Papa*, **7**(8): 86-93.
- Falcone, D., Ogas, J. and Somerville, C. (2004) Regulation of membrane fatty acid composition by temperature in mutants of *Arabidopsis* with alterations in membrane lipid composition. *BMC Plant Biology*, **17**: 4-17.
- FAOSTAT (2008). Potato world: Production and consumption. International Year of the Potato. Disponible en <http://www.potato2008.org/en/world/>.
- Food and Agriculture Organization (FAO) (2008): <http://www.fao.org/potato-2008/en/potato/cultivation.html>.
- Frère, M., Rea, J. and Rijks, J. (1975) Estudio agroclimatológico de la zona andina. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Roma.
- Fu, J., Chu, X., Sun, Y., Xu, Y., Hu, T. (2016) Involvement of nitric oxide in 5-aminolevulinic acid-induced antioxidant defense in roots of *Elymus nutans* exposed to cold stress. *Biol Plantarum*, **60**: 585–594.
- Gall, H., Philippe, F., Domon, J.-M., Gillet, F., Pelloux, J., and Rayon, C. (2015) Cell Wall metabolism in response to abiotic stress. *Plants*, **4**: 112–166. doi: 10.3390/plants4010112.
- Gaspar, Y., Johnson, K., McKenna, J., Bacic, A., Schultz, C. (2001) The complex structures of arabinogalactan-proteins and the journey towards understanding function. *Plant Molecular Biology*, **47**: 161-176.
- Gong, Y., Guo, Z., He, L., Li, J. (2011) Identification of maize genotypes with high tolerance or sensitivity to phosphorus deficiency. *Journal of Plant Nutrition*, **34**: 1290–1302.

- Griffith, M., Lumb, C., Wiseman, S., Wisniewski, M., Johnson, R. and Marangoni, AG. (2005) Antifreeze proteins modify the freezing process in plants. *Plant Physiology*, **138**: 330–40.
- Griffith, M. and Yaish, M. (2004) Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities. *Trends in Plant Science*, **9**: 399-405.
- Gulick, P., Drouin, S., Yu, Z., Poisson, G., Monroy, A. and Sarhan, F. (2005) Transcriptome comparison of winter and spring wheat responding to low temperature. *Genome*, **48**: 913–923.
- Guo, L., Yang, H., Zhang, X. and Yang, S (2013) Lipid transfer protein 3 as a target of MYB96 mediates freezing and drought stress in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, **64**: 755-767.
- Guo, Z., Ou, W., Lu, S. and Zhong Q. (2006) Differential responses of antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity. *Plant Physiology and Biochemistry*, **44**: 828–836.
- Gutiérrez, R. (2008) Papas nativas desafiando al cambio climático. Propuesta de adaptación tecnológica del cultivo de papas nativas frente al cambio climático en Cusco y Ancash. Soluciones prácticas ITDG. 82p.
- Guy, C, Haskell, D. and Li, Q. (1998) Association of proteins with the stress 70 molecular chaperones at low temperature: evidence for the existence of cold labile proteins in spinach. *Cryobiology*, **36**: 301–314.
- Head, S., Komori, H. and LaMere, S. (2014) Library construction for next-generation sequencing: Overviews and challenges. *BioTech*, **56**: 61-77.
- Heidarvand, L., Amiri, R. (2010) What happens in plant molecular responses to cold stress?. *Acta Physiologiae Plantarum*, **32**(3): 419 – 431
- Hon, W., Griffith, M., Mlynarz, A., Kwok, Y. and Yang, D. (1995) Antifreeze Proteins in Winter Rye Are Similar to Pathogenesis-Related Proteins. *Plant Physiology*, **109**: 879-889.
- Huamán, Z. and Spooner, D. (2002) Reclassification of landrace populations of cultivated potatoes (*Solanum* sect. Petota). *American Journal of Botany*, **89**(6): 947-965.
- Huamán, Z. (1986) Systematic botany and morphology of the potato. Technical Information bulletin, International Potato Center. Lima, Peru.

- Huang, G., Li, W., Zhou, W., Zhang, J., Li, D., Gong, S. *et al.* (2013) Seven cotton genes encoding putative NAC domain proteins are preferentially expressed in roots and in responses to abiotic stress during root development. *Plant Growth Regulation*, **71**: 101–112.
- Hughes, M. and Dunn, M. (1996) The molecular biology of plant acclimation to low temperature. *Journal of Experimental Botany*, **47**: 291-305.
- Hugly, S. and Somerville, C. (1992) A role for membrane lipid polyunsaturation in chloroplast biogenesis at low temperature. *Plant Physiology*, **99**: 197–202.
- Ibarra-Laclette, E., Albert, V., Pérez-Torres, C., Zamudio-Hernández, F., Ortega-Estrada, M., Herrera-Estrella, A. *et al.* (2011) Transcriptomics and molecular evolutionary rate analysis of the bladderwort (*Utricularia*), a carnivorous plant with a minimal genome. *BMC Plant Biology*, **11**: 101. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2229-11-101>.
- Instituto Nacional de Estadística e Informática (2014). Disponible en: <http://m.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/noticias/nota-de-prensa-n-082-2014-inei.pdf>
- Iturbe-Ormaeste, I., Escuredo, P., Arrese-Igor, C. and Becana, M. (1998) Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat. *Plant Physiology*, **116**: 173-181.
- Jaksik, R., Iwanaszko, M., Rzeszowska-Wolny J. and Kimmel, M. (2015) Microarray experiments and factors which affect their reliability. *Biology Direct*, **10**: 46. doi: 10.1186/s13062-015-0077-2.
- Jaleel, C., Gopi, R., Sankar, B., Manivannan, P., Kishorekumar, A., Sridharan, R. *et al.* (2007) Studies on germination, seedling vigour, lipid peroxidation and proline metabolism in *Catharanthus roseus* seedlings under salt stress. *South African Journal of Botany*, **73**: 190–195.
- Janska, A., Marsik, P., Zelenkova, S., Ovesna, J. (2010) Cold stress and acclimation - What is important for metabolic adjustment?. *Plant Biology*. **12**: 395-405.
- Jazayeri, S., Melgarejo, L. and Romero, H. (2015) Rna-seq: A glance at technologies and methodologies. *Acta Biologica Colombiana*, **20**(2): 23–35.
- Johnson, D., Mortazavi, A., Myers, R. and Wold, B. (2007) Genome-wide mapping of in vivo protein-DNA interaction. *Science*, **316**: 1497-1502.

- Johnson, K., Jones, B., Bacic, A. and Schultz, C. (2003) The fasciclin-like arabinogalactan proteins of *Arabidopsis*: a multigene family of putative cell adhesion molecules. *Plant Physiology*, **133**: 1911–1925.
- Kader, J. (1996) Lipid-transfer proteins in plants. *Annual Review Plant Physiology. Plant Molecular Biology*, **47**: 627-654.
- Klempnauer, K.H., Gonda, T.J., Bishop, J.M., (1982) Nucleotide sequence of the retroviral leukemia gene v-myb and its cellular progenitor c-myb: the architecture of a transduced oncogene. *Cell*, **31**: 453–463.
- Knight, M. and Knight, H. (2012) Low-temperature perception leading to gene expression and cold tolerance in higher plants. *New Phytologist*, **195**(4): 737-751.
- Knight, H. and Knight, M. (2001) 017. *Trends In Plant Science*, **6**(6): 262-267.
- Kovi, M., Ergon, A., Rognli, O. (2016) Freezing tolerance revisite deffects of variable temperatures on gene regulation in temperate grasses and legumes. *Current Opinion Plant Biology*, **33**:140–146.
- Lafarguette, F., Leplé, J., Déjardin, A., Laurans, F., Costa, G., Lesage-Descauses, M. *et al.* (2004) Poplar genes encoding fasciclin-like arabinogalactan proteins are highly expressed in tension wood. *New Phytologist*, **164**: 107–121.
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M. and Saizberg, S. (2009) ultrafast and memory efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology*, **10**(3): R25.
- Levitt, J. (1980) Responses of Plants to Environmental Stresses, Vol. 1, 2nd ed. Academic Press, New York.
- Liang, W., Wang, M. and Ai, X. (2009) The role of calcium in regulating photosynthesis and related physiological indexes of cucumber seedlings under low light intensity and suboptimal temperature stress. *Science Horticultural*, **123**: 34-38.
- Liang, M.; Davis, E.; Gardner, D.; Cai, X.; Wu, Y. (2006) Involvement of AtLAC15 in lignin synthesis in seeds and in root elongation of *Arabidopsis*. *Planta*, **224**: 1185–1196.
- Lichtenthaler H. (1996) Vegetation Stress: an Introduction to the stress concept in plants. *Journal of Plant Physiology*, **148**: 4-14.

- Lister, R., Gregory, B. and Ecker, J. (2009) Next is now: new technologies for sequencing of genomes, transcriptomes, and beyond. *Current Opinion Plant Biology*, **12**(2): 107-118. doi: 10.1016/j.pbi.2008.11.004.
- Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K. *et al.* (1998) Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought and low temperature responsive gene expression respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **10**: 1391–1406.
- Lucau-Danila, A., Laborde, L., Legrand, S., Huot, L., Hot, D., Lemoine, Y. *et al.* (2010) Identification of novel genes potentially involved in somatic embryogenesis in chicory (*Cichorium intybus* L.). *BMC Plant Biology*, **10**: 122. <http://doi.org/10.1186/1471-2229-10-122>.
- Luo, J., Zhou, J. and Zhang, J. (2018) Aux/IAA gene family in plants: molecular structure, regulation and function. *International Journal of Molecular Sciences*, **19**: 259.
- Lynch, D. and Steponkus, P. (1978) Plasma membrane alterations following cold acclimation and freezing possible relevance to Freeze Tolerance. *The Metabolism, Structure, and Function of Plant Lipids*. 213-215. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5263-1_38.
- Maali-Amiri, R., Goldenkova-Pavlova, IV., Pchelkin, V., Tsydendambaev, V., Vereshchagin, A., Deryabin, A., *et al.* (2007) Lipid Fatty Acid Composition of Potato Plants Transformed with the $\Delta 12$ -Desaturase Gene From Cyanobacterium. *Russian Journal of Plant Physiology*, **54**: 678-685.
- Mamani-Rojas, P. and François-Leden (2014) Efecto de la sequía en la morfología, crecimiento y productividad de genotipos de papa (*Solanum tuberosum* L) en Bolivia. *Revista Latinoamericana de la Papa*, **18**(1): 25-76.
- Martinez, D., López, E. and Neyra, E. (2018) Expresión diferencial de genes involucrados en la respuesta al estrés por helada en *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*. *Revista Peruana de Biología*, **25**(3): 325-328. doi: <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v25i3.15216>.
- Massa, A., Childs, K. and Buell, C. (2013) Abiotic and biotic stress responses in *Solanum tuberosum* group Phureja DM1-3 516 R44 as measured through

whole transcriptome sequencing. *Plant Genome*, **6**: 1-10. doi: 10.3835/plantgenome2013.05.0014.

- Min, H., Jung, Y., Kang, B. and Kim, W. (2016) CaPUB1, a hot pepper U-box E3 ubiquitin ligase, confers enhanced cold stress tolerance and decreased drought stress tolerance in transgenic rice (*Oryza sativa* L.). *Molecules and Cells*, **39**(3): 250–257. doi: 10.14348/molcells.2016.2290.
- MINAGRI (2017) Papa: Características de la Producción Nacional y de la Comercialización. Dirección General de Políticas Agrarias. Lima - Perú
- Miquel, M., James, D., Dooner, H. and Browse, J. (1993) Arabidopsis requires polyunsaturated lipids for low-temperature survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **90**: 6208-6212.
- Mohapatra, S., Wolfrum, L., Poole, R. and Dhindsa, R. (1989) Molecular cloning and relationship to freezing tolerance of cold acclimation specific genes of alfalfa. *Plant Physiology*, **89**: 375-380.
- Monk, L., Fagerstedt, K. and Crawford, R. (1989) Oxygen toxicity and superoxide dismutase as an antioxidant in physiological stress. *Physiologia Plantarum*, **76**: 456-459.
- Moraes de Freitas, G., Basu, S., Ramegowda, V., Braga, E. and Pereira, A. (2016) Comparative analysis of gene expression in response to cold stress in diverse rice genotypes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **471**(1): 1253-1259. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.02.004
- Morales S. (2017) Respuesta fisiológica de dos variedades de papas nativas (*Solanum tuberosum* sp. *andigena*) de Huancavelica “Yana Manwa” y “Yuraq Gaspar” frente a estrés térmico. Tesis para optar el grado de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias e Ingeniería. Universidad para el Desarrollo Andino. Acceso: 10/08/2018.
- Morris, E and Walker, J. (2003) Receptor-like protein kinase: the keys to response. *Current Opinion Plant Biology*, **6**: 339-342.
- Mortazavi, A., Willian, B., Mccue, K., Schaeffer, L. and Wold, B. (2008) Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods*, **5**: 621-628.
- Murata Mayara, Mari (2013) Transcriptoma da interação de tangerina satsuma (*Citrus unshiu*) e laranja doce hamlin (*Citrus sinensis*) infectadas com

Xanthomonas citri subsp. *citri*, agente causal do cancro cítrico. Universidade Estadual Paulista UNESP Campus de Jaboticabal. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

- Murata Separovich, Emi Jimena (2017) Caracterización de la expresión genética en respuesta a temperaturas de congelamiento en papas nativas tolerantes y susceptibles. Tesis para optar grado de Licenciada en Biología. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Perú.
- Murata, N. and Los, D. (1997) Membrane fluidity and temperature perception. *Plant Physiology*, **115**: 875–879.
- Nakaminami, K., Matsui, A., Nakagami, H., Minami, A., Nomura, Y., Tanaka, M., *et al.* (2014) Analysis of differential expression patterns of mRNA and protein during cold-and de-acclimation in *Arabidopsis*. *Molecular Cellular Proteomics*, **13**: 3602–3611. 10.1074/mcp.M114.039081.
- Nakashima, K., Takasaki, H., Mizoi, J., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2012) NAC transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1819**(2): 97–103. doi: 10.1016/j.bbagr.2011.10.005.
- Nakashima, K., Tran, L., Nguyen, D., Fujita, M., Maruyama, K., Todaka D. *et al.* (2007) Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. *Plant Journal*, **51**: 617–630. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03168.x.
- Nilsen, E. and Orcutt, D. (1996) Physiology of plants under stress. Abiotic factors. John Wiley and Sons, INC, New York.
- Nishida, I and Murata, N. (1996) Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria: The crucial contribution of membrane lipids. *Annual review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **47**:541-568.
- Nuruzzaman, M., Sharoni, M. and Kikuchi, S. (2013) Roles of NAC transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in plants. *Frontiers Microbiology*, **4**: 248. doi:10.3389/fmicb.2013.00248.
- Ochoa, C. (2001) Las Papas de Sudamérica: Bolivia. Centro Internacional de la Papa (CIP), Instituto Francés de Estudios Andinos (IFEA), Lima, Perú.

- Palva, E. and Heino, P. (1997) Molecular mechanism of plant cold acclimation and freezing tolerance. *Plant Cold Hardiness*. Plenum Press, New York. 3-14.
- Pearce, R. (1999) Molecular analysis of acclimation to cold. *Plant Growth Regulation*. **29**: 47–76.
- Pei, S., Sisu, C., Frankish, A., Howald, C., Habegger, L., Mu, X. *et al.* (2012) The GENCODE pseudogene resource. *Genome Biology*, **13**(9): R51.
- Peng, X., Wu, Q., Teng, L., Tang, F., Phi, Z. and Shen, S. (2015) Transcriptional regulation of the paper mulberry under cold stress as revealed by a comprehensive analysis of transcription factors. *BMC Plant Biology*, **15**: 108.
- Percival, G.C. and Fraser, S. A. (2001) Measurement of the salinity and freezing tolerance of *Crataegus* genotypes using chlorophyll fluorescence. *J. Arboriculture*. **27**(5): 233-245.
- Pino, M., Skinner, J., Park, E., Jeknic, Z., Hayes, P., Thomashow, M. *et al.* (2007) Use of a stress inducible promoter to drive ectopic AtCBF expression improves potato freezing tolerance while minimizing negative effects on tuber yield. *Plant Biotechnology Journal*, **5**(5): 591-604.
- Pinto, A., Melo-Barbosa, H., Miyoshi, A., Silva, A., Azevedo, V. (2011) Application of RNA-Seq to reveal the transcript profile in bacteria. *Genetic Molecular Research*, **10**(3): 1707-1718.
- Puranik, S., Sahu, P., Srivastava, P. and Prasad, M. (2012) NAC proteins: regulation and role in stress tolerance. *Trends Plant Science*, **17**: 369–381. 10.1016/j.tplants.2012.02.004.
- Purvis, A. and Shewfelt, R. (1993) Does the alternative pathway ameliorate chilling injury in sensitive plant tissues?. *Physiologia Plantarum*, **88**: 712-718.
- Qu, Y., Duan, M., Zhang, Z., Dong, J. and Wang T. (2016) Overexpression of the *Medicago falcate* NAC transcription factor *MfNAC3* enhances cold tolerance in *Medicago truncatula*. *Environmental and Experimental Botany*, **129**: 67-76.
- Quail, M., Smith, M., Coupland, P., Otto, T., Harris, S., Connor, T., *et al.* (2012) A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics*, **13**: 341-354.

- Rashid, M., Guangyuan, H., Guangxiao, Y., Hussain, J. and Xu, Y. (2012) AP2/ERF Transcription Factor in Rice: Genome-Wide Canvas and Syntenic Relationships between Monocots and Eudicots. *Evolutionary Bioinformatics*, **8**: 321-355.
- Ren, M., Venglat, P., Qiu, S., Feng, L., Cao, Y., Wang, E., *et al.* (2012) Target of rapamycin signaling regulates metabolism, growth, and life span in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **24**: 4850–4874. doi: 10.1105/tpc.112.107144.
- Rensink, W., Hart, A., Liu, J., Ouyang, S., Zismann, V. and Buell, C. (2005a) Analyzing the potato abiotic stress transcriptome using expressed sequence tags. *Genome*, **48**: 598–605.
- Rensink, W., Iobst, S., Hart, A., Stegalkina, S., Liu, J. and Buell, C. (2005b) Gene expression profiling of potato responses to cold, heat, and salt stress. *Functional Integral Genomic*, **5**: 201–207.
- Rihan, H., Al-Issawi, M. and Fuller, M. (2017) Advances in physiological and molecular aspects of plant cold tolerance. *Journal of Plant Interaction*, **12**: 143–157. doi: 10.1080/17429145.2017.1308568.
- Rio, D.C., Ares, M., Hannon, G. and Nilsen, T. (2010) *Cold Spring Harbor protocols*, **6**. doi: 10.1101/pdb.prot5439.
- Roca, W., Espinoza, C. and Panta, A. (2003) Potential of plant biotechnology for biodiversity research and utilization in Latin America and the Caribbean. *AgBioForum Journal*, **7**: 13-22.
- Sakai, A. and Larcher, W. (1987) Frost survival of plants. Berlin: Springer Verlag.
- Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. Second edition. ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sarad, N., Rathore, M., Singh, N. and Kumar, N. (2004) Genetically engineered tomatoes: New vista for sustainable agriculture in High altitude regions. In: 4th International Crop Science Congress, Brisbane, Australia.
- Schmieder, R. and Edwards, R. (2011) Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics*, **27**(6): 863–864.

- Schreiber, L., Hartmann, K., Skrabs, M and Zeier, J. (1999) Apoplastic barriers in roots: chemical composition of endodermal and hypodermal cell walls. *Journal Experimental Botany*, **50**: 1267-1280.
- Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología (SENAMHI) (2010). Atlas de heladas del Perú. Lima-Peru.
- Seppänen, M., and Coleman, G. (2003) Characterization of genotypic variation in stress gene expression and photosynthetic parameters in potato. *Plant Cell and Environment*, **26**(3): 401-410.
- Shani, E., Salehin, M., Zhang, Y., Sanchez, S., Doherty, C., Wang, R. *et al.* (2017) Plant stress tolerance requires auxin-sensitive Aux/IAA transcriptional repressors. *Current Biology*, **27**: 437-444.
- Sharma, P., Sharma, N. and Deswal, R. (2005) The molecular biology of the low-temperature response in plants. *BioEssays*, **27**(10): 1048-1059.
- Shi, Y., Ding, Y. and Yang, S. (2015) Cold Signal Transduction and its Interplay with Phytohormones During Cold Acclimation. *Plant Cell Physiology*, **56**(1): 7-15. doi:10.1093/pcp/pcu115.
- Sinha, S., Raxwal, V., Joshi, B., Jagannath, A., Katiyar-Agarwal, S., Goel, S. *et al.* (2015) De novo transcriptome profiling of cold-stressed siliques during pod filling stages in Indian mustard (*Brassica juncea* L.). *Frontiers in Plant Science*, **6**: 932.
- Song, J., Mo, X., Yang, H., Yue, L., Song, J., and Mo, B. (2017) The U-box family genes in *Medicago truncatula*: Key elements in response to salt, cold, and drought stresses. *PLoS ONE*, **12**(8): e0182402.
- Steponkus, PL. (1984) Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Annual Review of Plant Physiology*, **35**: 543–584.
- Stone, J., Palta, J., Bamberg, J., Weiss, L. and Harbage, J. (1993) Inheritance of freezing resistance in tuber-bearing *Solanum* species: evidence for independent genetic control of nonacclimated freezing tolerance and cold acclimation capacity. *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**: 7869-7873.
- Strauss, G. and Hauser, H. (1986) Stabilization of lipid bilayer vesicles by sucrose during freezing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **83**(8): 2422-2426.

- Su, C., Wang, Y., Hsieh, T., Lu, C., Tseng, T. and Yu, S. (2010) A novel MYBS3-dependent pathway confers cold tolerance in rice. *Plant Physiology*, **153**: 145–158.
- Suzuki, N., Koussevitzky, S., Mittler, R. and Miller, G. (2012) ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant, Cell Environment*, **35**: 259–270.
- Thomashow, M. (1999) Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **50**: 571-599.
- Thorlby, G., Fourier, N. and Warren, G. (2004) The sensitive to freezing gene, required for freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*, encodes a beta-glucosidase. *Plant Cell*, **16**: 2192–2203.
- Torres, C. and Cubas, H. (2007) Diagnóstico de cultivos y especies agroforestales nativas, en adaptación al cambio climático en el área del centro poblado de Huashao (Distrito de Yungay) y del caserío de Anta (Distrito de Shupluy. Lima, Perú: Editorial ITDG.
- Trans, L., Nakashima, K., Sakuma, Y., Simpson, S., Fujita, Y., Maruyama, K., *et al.* (2004) Isolation and functional analysis of *Arabidopsis* stress-inducible NAC transcription factor that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. *Plant Cell*, **16**: 2481–2498. 10.1105/tpc.104.022699.
- Trapnell, C., Hendrickson, DG, Sauvageau, M., Goff, L., Rinn, JL. And Pachter, L. (2013) Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. *Nature Biotechnology*, **31**(1): 46-53.
- Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D., Pimentel, H., Salzberg, S., Rinn, J. and Pachter, L. (2012) Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature Protocols*, **7**(3): 562-578.
- Trapnell, C., Williams, B., Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., Van Baren, M. *et al.* (2010) Transcript assembly and abundance estimation from RNA-Seq reveals thousands of new transcripts and switching among isoforms. *Nature Biotechnology*, **28**(5): 511–515. doi:10.1038/nbt.1621.

- Triveño, G., Ordinola, M., Samanamud, K., Fonseca, C., Manrique, K., Quevedo, M. (2011) Buenas Prácticas para el Desarrollo de la cadena productiva de Papa; Experiencias con el Proyecto INCOPA en el Perú. Centro Internacional de la papa. Lima- Perú. 130p.
- Valdés, A., Ibáñez, C., Simó, C., and García-Cañas, V. (2013) Recent transcriptomics advances and emerging applications in food science. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **52**: 142–154. <http://doi.org/10.1016/j.trac.2013.06.014>.
- Vanneste, S., and Friml, J. (2009) Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell*, **136**: 1005-1016.
- van Loon, L., Rep, M., Pieterse, C. (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, **44**: 135–162.
- Varshney, R., Nayak, S., May, G. and Jackson, S. (2009) Next-generation sequencing technologies and their implications for crop genetics and breeding. *Trends in Biotechnology*, **27**: 522-530.
- Vega, S. and Bamberg, J. (1995) Screening the US potato collection for frost hardiness. *American Potato Journal*, **72**(1): 13-21.
- Vogg, G., Heim, R., Gotschy, B., Beck, E., Hansen, J. (1998) Frost hardening and photosynthetic performance of Scots pine (*Pinussylvestris* L.) II. Seasonal changes in the fluidity of thylakoid membranes. *Planta*, **204**: 201-206.
- Wang, K., Zhen-yu, B., Qian-yu, L., Qing-lin, L., Zhang, L., Yuan-zhi, P. *et al.* (2018) Transcriptome analysis of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*) in response to low temperature stress. *BMC Genomics*. **19**: 319. doi: 10.1186/s12864-018-4706-x.
- Wang, J., Feng, J., Jia, W., Chang, S., Li, Y. (2015) Lignin engineering through laccase modification: a promising field for energy plant improvement. *Biotechnology for Biofuels*. **8**: 145.
- Wang, J., Yang, Y., Liu, X., Huang, J., Wang, Q., Gu, J. *et al.* (2014) Transcriptome profiling of the cold response and signaling pathways in *Lilium lancifolium*. *BMC Genomics*, **15**: 203.

- Wang, L., Zhao, S., Gu, C., Zhou, Y., Zhou, H., Ma, J., *et al.* (2013) Deep RNA-Seq uncovers the peach transcriptome landscape. *Plant Molecular Biology*, **83**: 365-377. <http://doi.org/10.1007/s11103-013-0093-5>.
- Wang, Z., Gerstein, M., and Snyder, M. (2009) RNASeq: A revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*. **10**: 57-63.
- Wang, C. (1995) Effect of temperature preconditioning on catalase, peroxidase and superoxide dismutase in chilled zucchini squash. *Postharvest Biology and Technology*, **5**: 67-76.
- Wolf, J. (2013) Principles of transcriptome analysis and gene expression quantification: An RNA-seq tutorial. *Molecular Ecology Resources*, **13**(4): 559-572. <http://doi.org/10.1111/1755-0998.12109>.
- Xie, X.L., Yin, X.R., Chen, K.S. (2016) Role of Ethylene responsive factors (ERFs) in abiotic stress mediated signaling in plants. *Journal of Biological Sciences*, **1**(1): 133-146.
- Xiong, L., Schunaker, KS and Zhu, J. (2002) Cell Signaling during Cold, Drought and Salt Stress. *The Plant Cell*, **14**(Suppl. 1) S165–S183. doi: <https://doi.org/10.1105/tpc.000596>.
- Xiu-Qing, L and Donglei, D. (2014) Variation, evolution and correlation analysis of G+C content and genome or chromosome size in different kingdoms and phyla. *Plos One*, **9**(2): e88339. doi:10.1371/journal.pone.0088339.
- Xu, H., Li, X. and Chen, J. (2017) Comparative transcriptome profiling of freezing stress responses in loquat (*Eriobotrya japonica*) fruitlets. *Journal of Plant Research*, **130**: 893-907.
- Xu, H., Kong, X., Chen, F., Huang, J., Lou, X and Zhao, J. (2015) Transcriptome analysis of *Brassica napus* using RNA-Seq and identification of lipid-related candidate genes. *BMC Genomics*, **16**: 858. doi: 10.1186/s12864-015-2062-7
- Yadav, S. (2010) Cold stress tolerance mechanisms in plants. *Journal Agronomy for Sustainable*. **30**(3): 515-527.
- Yang, L., Wu, K., Gao, P., Liu, X., Li, G. and Wu, Z. (2014) GsLRPK, a novel cold-activated leucine-rich repeat receptor-like protein kinase from *Glycine soja*, is a positive regulator to cold stress tolerance. *Plant Science*, **215–216**: 19-28. doi: 10.1016/j.plantsci.2013.10.009.

- Yanhui, C., Xiaoyuan, Y., Kun, H., Meihua, L., Jigang, L., Zhigiang, L et al. (2006) The MYB transcription factor superfamily of *Arabidopsis*: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. *Plant Molecular Biology*, **60**(1): 107-124.
- Zablackis, E., Huang, J., Muller, B., Darvill, A. and Albersheim P. (1995) Characterization of the cell wall polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Physiology*, **107**: 1129-1138.
- Zhao, D., Hamilton, JP., Hardigan, M., Yin, D., He, T., Vaillancourt, B. et al. (2017) Analysis of Ribosome-Associated mRNAs in Rice Reveals the Importance of Transcript Size and GC Content in Translation. *G3: GENES, GENOMES, GENETICS*, **7**: 203-219. <https://doi.org/10.1534/g3.116.036020>.
- Zheng, C., Zhao, L., Wang, Y., Shen, J., Zhang, Y., Jia S., et al. (2015) Integrated RNA-Seq and sRNA-Seq analysis identifies chilling and freezing responsive key molecular players and pathways in tea plant (*Camellia sinensis*). *PLoS ONE*, **10**: e0125031. [10.1371/journal.pone.0125031](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125031).
- Zheng, J., Fu, J., Gou, M., Huai, J., Liu, Y., Jian, M. et al. (2010) Genome-wide transcriptome analysis of two maize inbred lines under drought stress. *Plant Molecular Biology*, **72**: 407-421.
- Zheng, R. and Yang, Z. (1991) Lipid peroxidation and antioxidative defense systems in early leaf growth. *Journal of Plant Growth Regulation*, **10**: 187-199.
- Zhong, LJ., Dong, H., Cai, XB., Feng, YN., Ren, P., Cheng, FM. (2012) Gene expression of the key enzymes controlling starch synthesis and metabolism in rice grain endosperm under effects of high temperature after anthesis. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao*, **23**: 745–750.
- Zhu, YN., Shi, DQ., Ruan, MB., Zhang, LL., Meng, ZH., Liu, J., et al. (2013) Transcriptome analysis reveals crosstalk of responsive genes to multiple abiotic stresses in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *PLoS One*, **8**(11): e80218.

ANEXOS

ANEXO 1. EXTRACCIÓN DE RNA A PARTIR DE HOJAS

1. Lisis de células.

- Romper el tejido con nitrógeno líquido.
- Colocar 1 mL de TRI REAGENT (Sigma T9424)
- Centrifugar la solución homogenizada a 12 000 g por 10 minutos a 4°C para remover el material insoluble.
- Transferir el sobrenadante a un tubo de centrífuga y dejar a temperatura ambiente por 5 minutos.

2. Fase de separación

- Adicionar 0.2 mL de cloroformo y mediante un shaker homogenizar por 15 segundos.
- Dejar la solución a temperatura ambiente por 10 minutos y centrifugar a 12 000 g por 15 minutos a 4°C.
- Transferir la fase superior acuosa sin color (RNA) a un nuevo tubo eppendorf (la interfase concierne al DNA y la parte inferior a las proteínas).

3. Precipitación de RNA

- Adicionar 500 µL de isopropanol, mezclar y dejar a temperatura ambiente por 10 minutos.
- Centrifugar (12 000 g, 10 min, 4°C) y lavar el pellet de RNA adicionando 1 mL de Etanol al 75%. (Vortexear y centrifugar a 12 000, 5 min, 4°C)
- Enseguida dejar secar el pellet de RNA por 10 minutos.

4. Solubilización de RNA

- Adicionar 50 µL de agua libre de nucleasa al pellet de RNA

ANEXO 2. DEGs exclusivos sobreexpresados en la variedad tolerante de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* tras el estrés por helada

#	Gen	Locus	Cambio expresión en variedad tolerante
1	Ripening regulated protein DDTFR18	PGSC0003DMG400002124	7.58752
2	U-box ligase	PGSC0003DMG400032232	5.92018
3	Nodulin	PGSC0003DMG400029744	5.36215
4	TSI-1 protein	PGSC0003DMG400001550	4.82016
5	Polygalacturonase	PGSC0003DMG400021630	4.73224
6	Mta/sah nucleosidase	PGSC0003DMG400029085	4.61947
7	AT-HSFB3 (Arabidopsis thaliana heat shock transcription factor B3)	PGSC0003DMG40008713	4.55907
8	SAUR family protein	PGSC0003DMG400001274	4.52549
9	Extensin	PGSC0003DMG400000776	4.51696
10	ATP-binding cassette transporter	PGSC0003DMG400016797	4.48119
11	ATP-binding	PGSC0003DMG400016797	4.46983
12	Protein binding	PGSC0003DMG400023511	4.42096
13	Proteinase inhibitor IIa	PGSC0003DMG400030593	4.27216
14	Cytochrome P450	PGSC0003DMG400007565	4.20528
15	Conserved gene of unknown function	PGSC0003DMG400008880	4.12221
16	Spotted leaf protein	PGSC0003DMG400014732	4.00233
17	Nectarin 5	PGSC0003DMG400021178	3.96617
18	Non-specific lipid-transfer protein	PGSC0003DMG400025538	3.96039
19	Hemoglobin	PGSC0003DMG400030927	3.95033
20	Beta-expansin 3	PGSC0003DMG400021682	3.93851
21	Cytochrome P450 92B1	PGSC0003DMG400018064	3.88136
22	ATP binding protein	PGSC0003DMG400028986	3.86766
23	ATP-binding	PGSC0003DMG400016797	3.85769
24	Basic blue copper protein	PGSC0003DMG400023751	3.77563
25	Non-specific lipid-transfer protein	PGSC0003DMG400025537	3.75406
26	Sucrose synthase	PGSC0003DMG400031046	3.68546
27	Plastid-targeted protein 2	PGSC0003DMG400030843	3.68443
28	Lemir	PGSC0003DMG400015219	3.65082
29	Aromatic amino acid decarboxylase 1B	PGSC0003DMG400029050	3.64712
30	Cysteine protease 14	PGSC0003DMG400029400	3.64343
31	Respiratory burst oxidase homolog protein B	PGSC0003DMG400024754	3.60929
32	ATP-binding cassette	PGSC0003DMG400016797	3.60614

	transporter		
33	Cysteine protease 14	PGSC0003DMG400009921	3.58138
34	Unidentified	PGSC0003DMG400028517	3.50554
35	Xyloglucan endotransglycosylase hydrolase	PGSC0003DMG400004109	3.49962
36	OJ991214 12.16 protein	PGSC0003DMG400007602	3.48014
37	ATERF-2/ATERF2/ERF2	PGSC0003DMG400026260	3.46989
38	Protein trichome birefringence- like 33	PGSC0003DMG400023940	3.46006
39	UDP- glucose:glucosyltransferase	PGSC0003DMG400019483	3.44958
40	Nectarin 5	PGSC0003DMG400021216	3.39982
41	Polygalacturonase non-catalytic subunit AroGP2	PGSC0003DMG400030978	3.39364
42	GMP synthase [glutamine- hydrolyzing] subunit A	PGSC0003DMG400011159	3.37686
43	Acireductone dioxygenase	PGSC0003DMG400016067	3.37518
44	Aromatic amino acid decarboxylase 1B	PGSC0003DMG400029046	3.36589
45	Nucleic acid binding protein	PGSC0003DMG400025474	3.3561
46	Phospholipase A1	PGSC0003DMG400010221	3.3511
47	Vetispiradiene synthase 1	PGSC0003DMG400018245	3.3474
48	Class IV chitinase	PGSC0003DMG400025063	3.32531
49	Peroxidase	PGSC0003DMG400005062	3.31072
50	Gamma-glutamyl-gamma- aminobutyrate hydrolase	PGSC0003DMG400026382	3.29369
51	Primary amine oxidase	PGSC0003DMG400030082	3.27851
52	Cytochrome P450 A	PGSC0003DMG400015185	3.27514
53	Pectinesterase	PGSC0003DMG403024767	3.27377
54	NAC domain protein	PGSC0003DMG400001223	3.26162
55	Leucine-rich repeat protein	PGSC0003DMG400030009	3.24732
56	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 1	PGSC0003DMG400024755	3.24247
57	Beta-phellandrene synthase	PGSC0003DMG400034278	3.23862
58	Dopamine beta- monooxygenase	PGSC0003DMG400006159	3.20493
59	SBP (S-ribonuclease binding protein) family protein	PGSC0003DMG400026724	3.18186
60	Patellin-4	PGSC0003DMG400021106	3.169
61	Major latex	PGSC0003DMG400008485	3.15471
62	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase family protein	PGSC0003DMG400006462	3.15076
63	Pectin methylesterase inhibitor isoform	PGSC0003DMG400012017	3.12058
64	Microsomal oleic acid desaturase	PGSC0003DMG400041652	3.11264
65	TSI-1 protein	PGSC0003DMG400029341	3.11166
66	Miraculin	PGSC0003DMG400010149	3.08385

67	NADH-plastoquinone oxioreductase subunit 4	PGSC0003DMG401011339	3.08355
68	Alcohol dehydrogenase 3	PGSC0003DMG400030771	3.0682
69	Gene of unknown function	PGSC0003DMG400010759	3.03415
70	Rhcadhesin receptor	PGSC0003DMG400024569	3.03083
71	Conserved gene of unknown function	PGSC0003DMG400029863	3.02827
72	Protein serine / threonine kinase	PGSC0003DMG400008403	3.00124
73	Wound induced protein	PGSC0003DMG400018397	2.9999
74	ASR3	PGSC0003DMG400024569	2.9991
75	Dicyanin	PGSC0003DMG400030918	2.97897
76	Glutaredoxin family protein	PGSC0003DMG400016572	2.97232
77	Laccase	PGSC0003DMG400020355	2.94802
78	Pectin methylesterase inhibitor isoform	PGSC0003DMG400028048	2.94627
79	NbPCL1 protein	PGSC0003DMG400002144	2.93116
80	DUF241 domain containing protein	PGSC0003DMG400009973	2.91375
81	Plant cell wall protein SITFR88	PGSC0003DMG400020886	2.91214
82	Vacuolar protein sorting- associated protein 2 homolog 2	PGSC0003DMG400021197	2.89033
83	Aromatic amino acid decarboxylase 1A	PGSC0003DMG400014779	2.88499
84	Acetylglucosaminyltransferase	PGSC0003DMG400007331	2.88391
85	Beta-galactosidase	PGSC0003DMG400004842	2.88048
86	Unknown	-	2.87019
87	Conserved gene of unknown function	PGSC0003DMG400000126	2.8494
88	Monothiol glutaredoxin-S2	PGSC0003DMG400010767	2.83713
89	Lysine/histidine transporter	PGSC0003DMG400000818	2.83673
90	Sucrose synthase	PGSC0003DMG400016730	2.83164
91	Ethylene receptor	PGSC0003DMG400017186	2.82989
92	Cytochrome P450	PGSC0003DMG400012669	2.79887
93	Endo-1,4-beta-glucanase	PGSC0003DMG400003774	2.79636
94	Glycosyltransferase	PGSC0003DMG400015709	2.78953
95	ZPT2-13	PGSC0003DMG400015558	2.7826
96	Ferritin	PGSC0003DMG400029195	2.78258
97	E3 ubiquitin-protein ligase RMA1H1	PGSC0003DMG400021683	2.78196
98	Membrane protein	PGSC0003DMG400006137	2.75448
99	Conserved gene of unknown function	PGSC0003DMG400005719	2.74354
100	Conserved gene of unknown function	PGSC0003DMG400014938	2.73505
101	P450 mono-oxygenase	PGSC0003DMG400003345	2.72866
102	MYB domain class transcription factor	PGSC0003DMG40003771	2.71998
103	DUF579 domain containing	PGSC0003DMG400031183	2.71929

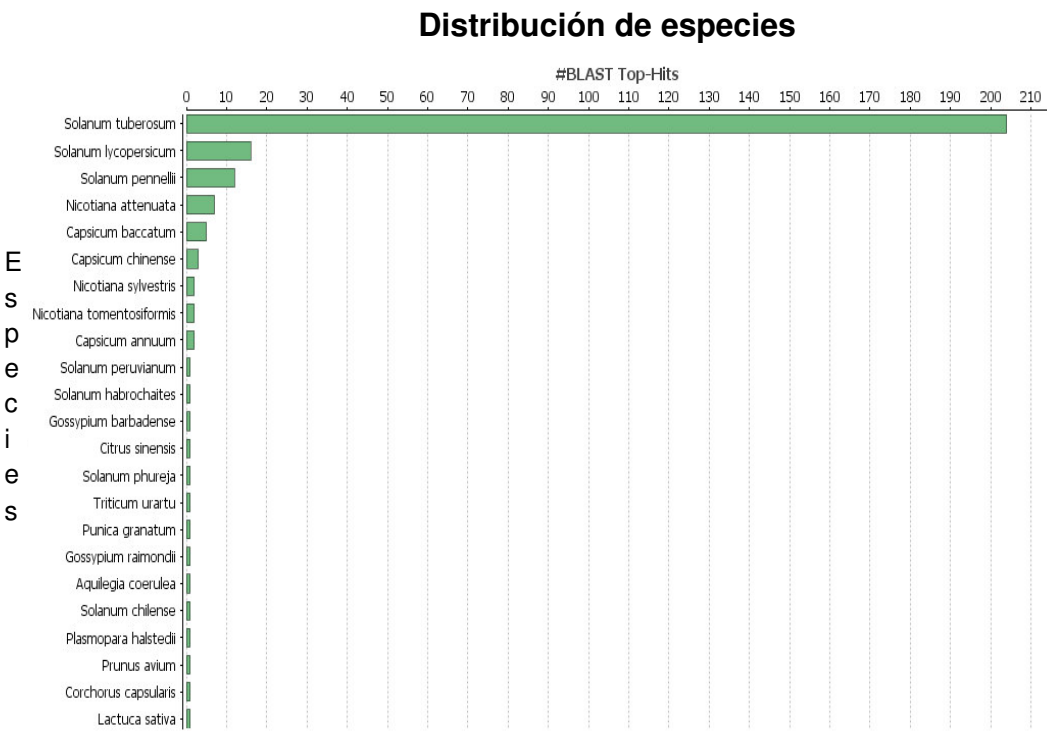
	protein		
104	NtPRp27	PGSC0003DMG400006276	2.71283
105	Xyloglucan endotransglucosylase- hydrolase XTH9	PGSC0003DMG400007794	2.70206
106	Beta-galactosidase	PGSC0003DMG400015211	2.69922
107	Lysine/histidine transporter	PGSC0003DMG400011690	2.69343
108	Octicosapeptide/Phox/Bem1p	PGSC0003DMG400027075	2.69184
109	Glutathione S-transferase	PGSC0003DMG400002163	2.68913
110	Cytochrome P72A57	PGSC0003DMG400017314	2.68859
111	Serine-threonine protein kinase	PGSC0003DMG400016015	2.66437
112	ACRE 132	PGSC0003DMG400047336	2.6619
113	Epoxide hydrolase	PGSC0003DMG400031790	2.65569
114	Auxin response factor 5	PGSC0003DMG400003771	2.64783
115	Peptide transporter	PGSC0003DMG400024120	2.62753
116	Phytosulfokine peptide	PGSC0003DMG400021407	2.62126
117	Glutaredoxin	PGSC0003DMG400010764	2.61921
118	Short chain alcohol dehydrogenase	PGSC0003DMG400008389	2.60514
119	Conserved gene of unknown function	PGSC0003DMG400004152	2.60235
120	Cytochrome P450-dependent fatty acid hydroxylase	PGSC0003DMG400018744	2.58565
121	Conserved gene of unknown function	PGSC0003DMG400027111	2.58527
122	Invertase	PGSC0003DMG400013553	2.57618
123	Ubiquitin	PGSC0003DMG400012141	2.57186
124	Unknown	-	2.57177
125	Extensin	PGSC0003DMG400006027	2.56603
126	GAST1 protein	PGSC0003DMG400007621	2.55526
127	Brassinosteroid LRR receptor kinase	PGSC0003DMG400024661	2.54396
128	Gene of unknown function	PGSC0003DMG400015617	2.54043
129	Caffeoyl-CoA O- methyltransferase 5	PGSC0003DMG400006214	2.53734
130	Retroelement pol polyprotein	PGSC0003DMG400015768	2.53432
131	Self-pruning interacting protein 1	PGSC0003DMG400023483	2.50803
132	TRANSPARENT TESTA 1 protein	PGSC0003DMG400007112	2.49592
133	MLO1	PGSC0003DMG400030134	2.49527
134	Ocs element-binding factor	PGSC0003DMG400001387	2.48701
135	Gonadotropin beta chain	PGSC0003DMG400024474	2.48163
136	Calmodulin-binding protein	PGSC0003DMG400005390	2.46178
137	F-box/leucine rich repeat protein	PGSC0003DMG400019300	2.44979
138	Calmodulin	PGSC0003DMG400033565	2.44884
139	Conserved gene of unknown function	PGSC0003DMG400019879	2.44619

140	ARPC2B	PGSC0003DMG400017199	2.4449
141	ATP binding protein	PGSC0003DMG400028801	2.43776
142	Pentatricopeptide repeat-containing protein	PGSC0003DMG400008347	2.42129
143	Hsp20	PGSC0003DMG400008713	2.39256
144	Acyl-carrier-protein] desaturase	PGSC0003DMG400044730	2.3756
145	Protein LURP1	PGSC0003DMG40002314	2.37322
146	Pleiotropic drug resistance protein 1	PGSC0003DMG402029631	2.35996
147	Peroxidase 4	PGSC0003DMG400025084	2.34652
148	Endo-alpha-1,4-glucanase	PGSC0003DMG402005942	2.34646
149	PME inhibitor	PGSC0003DMG400012019	2.34591
150	Transactivator factor	PGSC0003DMG400018905	2.31486
151	Gene of unknown function	PGSC0003DMG400025429	2.30596
152	Auxin-induced protein AUX22	PGSC0003DMG400002636	2.30072
153	Sensory transduction histidine kinase	PGSC0003DMG400019518	2.29749
154	Pseudouridine synthase	PGSC0003DMG400031535	2.29653
155	NtPRp27	PGSC0003DMG400006276	2.29089
156	CMPG1b	PGSC0003DMG400022775	2.2876
157	Avr9/Cf-9 induced kinase 1	PGSC0003DMG400002327	2.28577
158	Zinc finger protein	PGSC0003DMG400006951	2.28244
159	Chitinase	PGSC0003DMG400008673	2.27788
160	Unknown		2.27159
161	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase	PGSC0003DMG400000519	2.26698
162	Glutaredoxin	PGSC0003DMG400016032	2.26155
163	Serine/threonine-protein kinase	PGSC0003DMG400017337	2.24068
164	Protein serine/threonine kinase	PGSC0003DMG400022391	2.23046
165	Auxin-responsive protein IAA16	PGSC0003DMG400005327	2.2269
166	Arabinogalactan-protein	PGSC0003DMG400017756	2.21296
167	Polygalacturonase	PGSC0003DMG400008492	2.20279
168	DUF538 domain containing protein	PGSC0003DMG400025016	2.19876
169	Harpin-induced family protein	PGSC0003DMG400005898	2.19579
170	Ring finger protein	PGSC0003DMG400009405	2.19423
171	Germin 12	PGSC0003DMG400013096	2.17794
172	Gene of unknown function	PGSC0003DMG400004576	2.17297
173	Thaumatococcus	PGSC0003DMG400004259	2.17136
174	Fatty acid desaturase	PGSC0003DMG400028650	2.16307
175	Gene of unknown function	PGSC0003DMG400031309	2.14962
176	Heavy metal-associated domain containing protein	PGSC0003DMG400019410	2.14962
177	Brassinosteroid LRR receptor kinase	PGSC0003DMG400026792	2.14213
178	DNA binding protein	PGSC0003DMG400000824	2.1415
179	SET domain protein	PGSC0003DMG400024094	2.13165

180	Defective in induced resistance 3 protein D1R1	PGSC0003DMG400002487	2.13097
181	Caryophyllene/alpha-humulene synthase	PGSC0003DMG400020595	2.11435
182	Gene of unknown function	PGSC0003DMG402004013	2.11083
183	Branched chain alpha-keto acid dehydrogenase E1-alpha subunit	PGSC0003DMG400024860	2.10734
184	COL domain class transcription factor	PGSC0003DMG400025414	2.10329
185	Acetylcholinesterase	PGSC0003DMG400009611	2.10171
186	Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein 216	PGSC0003DMG400020564	2.09918
187	Transcription factor TSRF1	PGSC0003DMG400017231	2.09629
188	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase	PGSC0003DMG400029028	2.09488
189	PHAVOLUTA-like HD-ZIPIII protein	PGSC0003DMG400011810	2.08922
190	Stellacyanin	PGSC0003DMG400004317	2.08544
191	Translocation transactivator/inclusion body protein	PGSC0003DMG400022682	2.07977
192	ORF 137	PGSC0003DMG400039021	2.07217
193	Conserved gene of unknown function	PGSC0003DMG400019195	2.06451
194	NAC domain protein	PGSC0003DMG400019092	2.06059
195	Multicopper oxidase	PGSC0003DMG400010025	2.05834
196	GDLS-like Lipase/Acylhydrolase family protein	PGSC0003DMG400006461	2.05584
197	Plasma membrane associated protein/AWPM-19	PGSC0003DMG400004354	2.0473
198	Cytoplasmic small heat shock protein class I	PGSC0003DMG400023922	2.04442
199	NAC domain protein	PGSC0003DMG400039898	2.0429
200	DUF26 domain-containing protein 2	PGSC0003DMG400013176	2.03461
201	Caspase	PGSC0003DMG400012553	2.0328
202	SP1L	PGSC0003DMG400012325	2.03108
203	Fragment	PGSC0003DMG400003789	2.0282
204	Zinc finger protein	PGSC0003DMG401014997	2.0269
205	Cold regulated protein 27	PGSC0003DMG400006224	2.01394
206	O-fucosyltransferase family protein	PGSC0003DMG400026516	2.01393

ANEXO 3. Distribución de las especies más representadas, a partir de los resultados generados por homología de secuencias de los genes para la variedad tolerante “Yana Manwa” (A) y susceptible “Yuraq Gaspar” de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* (B) al estrés por helada.

A)



B)

